This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.

+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.

+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.

+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at `http://books.google.com/`

Über dieses Buch

Dies ist ein digitales Exemplar eines Buches, das seit Generationen in den Regalen der Bibliotheken aufbewahrt wurde, bevor es von Google im Rahmen eines Projekts, mit dem die Bücher dieser Welt online verfügbar gemacht werden sollen, sorgfältig gescannt wurde.

Das Buch hat das Urheberrecht überdauert und kann nun öffentlich zugänglich gemacht werden. Ein öffentlich zugängliches Buch ist ein Buch, das niemals Urheberrechten unterlag oder bei dem die Schutzfrist des Urheberrechts abgelaufen ist. Ob ein Buch öffentlich zugänglich ist, kann von Land zu Land unterschiedlich sein. Öffentlich zugängliche Bücher sind unser Tor zur Vergangenheit und stellen ein geschichtliches, kulturelles und wissenschaftliches Vermögen dar, das häufig nur schwierig zu entdecken ist.

Gebrauchsspuren, Anmerkungen und andere Randbemerkungen, die im Originalband enthalten sind, finden sich auch in dieser Datei – eine Erinnerung an die lange Reise, die das Buch vom Verleger zu einer Bibliothek und weiter zu Ihnen hinter sich gebracht hat.

Nutzungsrichtlinien

Google ist stolz, mit Bibliotheken in partnerschaftlicher Zusammenarbeit öffentlich zugängliches Material zu digitalisieren und einer breiten Masse zugänglich zu machen. Öffentlich zugängliche Bücher gehören der Öffentlichkeit, und wir sind nur ihre Hüter. Nichtsdestotrotz ist diese Arbeit kostspielig. Um diese Ressource weiterhin zur Verfügung stellen zu können, haben wir Schritte unternommen, um den Missbrauch durch kommerzielle Parteien zu verhindern. Dazu gehören technische Einschränkungen für automatisierte Abfragen.

Wir bitten Sie um Einhaltung folgender Richtlinien:

+ *Nutzung der Dateien zu nichtkommerziellen Zwecken* Wir haben Google Buchsuche für Endanwender konzipiert und möchten, dass Sie diese Dateien nur für persönliche, nichtkommerzielle Zwecke verwenden.

+ *Keine automatisierten Abfragen* Senden Sie keine automatisierten Abfragen irgendwelcher Art an das Google-System. Wenn Sie Recherchen über maschinelle Übersetzung, optische Zeichenerkennung oder andere Bereiche durchführen, in denen der Zugang zu Text in großen Mengen nützlich ist, wenden Sie sich bitte an uns. Wir fördern die Nutzung des öffentlich zugänglichen Materials für diese Zwecke und können Ihnen unter Umständen helfen.

+ *Beibehaltung von Google-Markenelementen* Das "Wasserzeichen" von Google, das Sie in jeder Datei finden, ist wichtig zur Information über dieses Projekt und hilft den Anwendern weiteres Material über Google Buchsuche zu finden. Bitte entfernen Sie das Wasserzeichen nicht.

+ *Bewegen Sie sich innerhalb der Legalität* Unabhängig von Ihrem Verwendungszweck müssen Sie sich Ihrer Verantwortung bewusst sein, sicherzustellen, dass Ihre Nutzung legal ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass ein Buch, das nach unserem Dafürhalten für Nutzer in den USA öffentlich zugänglich ist, auch für Nutzer in anderen Ländern öffentlich zugänglich ist. Ob ein Buch noch dem Urheberrecht unterliegt, ist von Land zu Land verschieden. Wir können keine Beratung leisten, ob eine bestimmte Nutzung eines bestimmten Buches gesetzlich zulässig ist. Gehen Sie nicht davon aus, dass das Erscheinen eines Buchs in Google Buchsuche bedeutet, dass es in jeder Form und überall auf der Welt verwendet werden kann. Eine Urheberrechtsverletzung kann schwerwiegende Folgen haben.

Über Google Buchsuche

Das Ziel von Google besteht darin, die weltweiten Informationen zu organisieren und allgemein nutzbar und zugänglich zu machen. Google Buchsuche hilft Lesern dabei, die Bücher dieser Welt zu entdecken, und unterstützt Autoren und Verleger dabei, neue Zielgruppen zu erreichen. Den gesamten Buchtext können Sie im Internet unter `http://books.google.com` durchsuchen.

Ex-libris
Charles Atwood
Kofoid

THE LIBRARY
OF
THE UNIVERSITY
OF CALIFORNIA

PRESENTED BY
PROF. CHARLES A. KOFOID AND
MRS. PRUDENCE W. KOFOID

Untersuchungen

über

künstliche Parthenogenese

und

das Wesen des Befruchtungsvorgangs

Von

Jacques Loeb
Professor der Physiologie an der University of California

Deutsche Ausgabe unter Mitwirkung des Verfassers

herausgegeben von

E. Schwalbe
a. o. Professor an der Universität Heidelberg

Mit 12 Abbildungen

Leipzig
Verlag von Johann Ambrosius Barth
1906

Spamersche Buchdruckerei in Leipzig.

K- 1H437
L74

Vorwort.

Der freundlichen Aufforderung von Herrn Professor Schwalbe, ein kurzes Vorwort zu schreiben, leiste ich gerne Folge. Die Arbeiten, welche hier in einem Bande vereinigt sind, waren in der Absicht unternommen worden, eine Einsicht in das Wesen des Befruchtungsvorgangs zu gewinnen. Der einzige Weg zu diesem Ziele schien, meiner Ansicht nach, darin zu bestehen, chemische oder physikalische Methoden zu finden, durch die es möglich ist, den Einfluß des Spermatozoons auf die Entwicklungserregung in allen Einzelheiten nachzuahmen. Sobald das gelungen war, bestand die nächste Aufgabe darin, die Einwirkung dieser chemisch-physikalischen Agentien genauer zu untersuchen. Die hier gesammelten Arbeiten bringen diese Trennung der Aufgabe zum Ausdruck. In den ersten Arbeiten kam es zunächst darauf an, die Tatsache der künstlichen Parthenogenese über jeden Zweifel sicher zu stellen. Alle möglichen Fehlerquellen mußten berücksichtigt und ausgeschaltet werden. Es war zudem auch wichtig festzustellen, ob es sich nur um ein vereinzeltes, für die Seeigel gültiges Phänomen handelte, oder ob die künstliche Parthenogenese so

M370557

ausgedehnt sei, wie die Erscheinung der Befruchtung selbst. Die hier vorliegenden Arbeiten zeigen, daß sicher die Eier der Würmer und Mollusken zur künstlichen Parthenogenese veranlaßt werden können, und ich zweifle nicht daran, daß, wenn irgend eine Grenze für das Gelingen derartiger Versuche besteht, nur technische und nicht prinzipielle Schwierigkeiten zugrunde liegen.

Der zweite und für mich interessantere Teil dieser Untersuchungen beschäftigt sich mit der Frage nach der chemischen und physikalischen Natur des Befruchtungsvorgangs. Diese Versuche beginnen mit den Abhandlungen über eine verbesserte Methode der künstlichen Parthenogenese und ich bin zurzeit mit der Fortsetzung derselben beschäftigt. Es scheint sich mehr und mehr herauszustellen, daß das Wesen der Entwicklungserregung in der Anregung resp. Beschleunigung von Oxydationsvorgängen im Ei besteht, sowie in der Synthese von Nucleinsubstanzen aus Protoplasmabestandteilen. Es ist möglich, daß beide Vorgänge zusammenhängen und daß oxydative Synthesen dabei stattfinden.

Herrn Professor Schwalbe sowie dem Verleger Herrn A. Meiner spreche ich meinen verbindlichsten Dank aus.

Berkeley, Cal., 5. Juli 1906.

Jacques Loeb.

Inhaltsverzeichnis.

		Seite
I.	Experimente über Furchung	1
II.	Über die Natur des Befruchtungsprozesses und die künstliche Erzeugung von normalen Larven (Plutei) aus den unbefruchteten Eiern des Seeigels	19
III.	Über die Ionen der Eiweißsubstanzen und ihre Rolle in der Mechanik der Lebenserscheinungen. — Der giftige Charakter einer reinen NaCl-Lösung	26
IV.	Über die verschiedenen Wirkungen der Ionen auf myogene und neurogene rhythmische Zusammenziehungen und auf embryonales und Muskelgewebe	50
V.	Über die künstliche Erzeugung von normalen Larven aus den unbefruchteten Eiern des Seeigels (Arbacia)	77
VI.	Über die künstliche Parthenogenese bei Seeigeln	149
VII.	Weitere Experimente über künstliche Parthenogenese und die Natur des Befruchtungsprozesses	154
VIII.	Experimente über künstliche Parthenogenese bei Anneliden (Chaetopterus) und die Natur des Befruchtungsprozesses	167
IX.	Über Eireifung, natürlichen Tod und Verlängerung des Lebens beim unbefruchteten Seesternei (Asterias Forbesii) und deren Bedeutung für die Theorie der Befruchtung	237
X.	Über Methoden und Fehlerquellen der Versuche über künstliche Parthenogenese	267
XI.	Weitere Versuche über künstliche Parthenogenese	278
XII.	Künstliche Parthenogenesis bei Mollusken . . .	283
XIII.	Über Befruchtung, künstliche Parthenogenese und Cytolyse des Seeigels	288
XIV.	Über die Natur der Lösungen, in welchen sich die Seeigeleier zu entwickeln vermögen . . .	303

Seite

XV. Über eine verbesserte Methode künstlicher Parthenogenesis (erste Mitteilung) 315
XVI. Über eine verbesserte Methode künstlicher Parthenogenese (zweite Mitteilung) 322
XVII. Über eine verbesserte Methode künstlicher Parthenogenese (dritte Mitteilung) 329
XVIII. Künstliche Membranbildung und chemische Befruchtung bei einem Seestern (Asterina) 349
XIX. Über eine chemische Methode, durch welche Molluskeneier (Lottia gigantea) zur Reife gebracht werden können 369
XX. Über die Befruchtung von Seeigeleiern durch Seesternsamen 382
XXI. Über die Reaktion des Seewassers und die Rolle der Hydroxylionen bei der Befruchtung der Seeigeleier 437
XXII. Weitere Versuche über heterogene Hybridisation bei Echinodermen 440
XXIII. Die Giftigkeit des atmosphärischen Sauerstoffes für die Eier des Seeigels (Strongylocentrotus purpuratus) nach dem Prozeß der Membranbildung 483
XXIV. Von der Notwendigkeit des Vorhandenseins von freiem Sauerstoff in dem hypertonischen Seewasser für die Erzeugung künstlicher Parthenogenese 491
XXV. Über die Hemmung der Giftwirkung der hypertonischen Lösungen auf das befruchtete und unbefruchtete Ei des Seeigels durch Sauerstoffmangel 507
Register 521

Berichtigungen:

Seite 26, Überschrift lies: „Über Ionen-Eiweißverbindungen" statt Ionen der Eiweißsubstanzen.

Seite 124, Zeile 17 von oben lies: „Vermehrung" statt Verminderung.

I.

Experimente über Furchung[1]).

In dem zweiten Teil meiner „Untersuchungen zur physiologischen Morphologie“[2]) zeigte ich, daß Regeneration und Wachstum bei Tieren, sowohl wie bei Pflanzen, eine Funktion der Menge des Wassers ist, welches in den Zellen enthalten ist. Als ich die Menge des Wassers in den Zellen der Hydroiden vermehrte, indem ich diese Organismen in verdünnteres Seewasser brachte, als dasjenige, in welchem sie gewöhnlich leben, vergrößerte sich das Maß des Wachstums mit der Abnahme der Konzentration des Seewassers. Als ich die Wassermenge in den Geweben der Hydroiden verminderte, indem ich diese Tiere in eine konzentriertere Lösung, als das normale Seewasser darstellt, brachte, verminderte sich dementsprechend das Maß des Wachstums.

Wir wissen, daß der Samen der Pflanzen Wasser gebraucht, um sich zu entwickeln. Ebenso ist es bei dem tierischen Ei, wie kürzlich von mir angestellte For-

[1]) Journal of Morphology. VII, 1892, S. 253.
[2]) Würzburg 1892. Teil I, S. 191.

schungen über die Entwicklung von Seeigeln, Seesternen, Arthropoden und Fischen gezeigt haben. Wenn wir die Menge des Wassers, welches in dem Ei des Seeigels enthalten ist, vermindern, indem wir es in konzentrierteres Seewasser bringen, wird der Prozeß der Furchung verzögert, solange die Zunahme der Konzentration gering ist. Sobald jedoch die Konzentration größer wird, teilt sich das befruchtete Ei gar nicht.

In einem Falle waren die Eier vormittags 9 Uhr 40 befruchtet worden. Wenige Minuten nach der Befruchtung wurde ein Teil (a) der Eier in Seewasser gelegt, zu welchem 1 g NaCl auf 100 ccm hinzugefügt worden war. Ein zweiter Teil (b) wurde in Seewasser gelegt, zu dem ich 1,3 g NaCl auf 100 ccm zugesetzt hatte. Ein dritter Teil (c) wurde in Seewasser gebracht, dessen Konzentration durch den Zusatz von 2 g NaCl auf 100 ccm vermehrt worden war und ein vierter Teil (d) blieb im normalen Seewasser. Um 10 Uhr 50 waren beinahe alle Eier, welche im normalen Seewasser geblieben waren, im zweizelligen Zustande, während noch keins der Eier in den andern Lösungen geteilt war. In Teil (a) furchte sich das erste Ei 10 Uhr 55, in (b) fand die erste Teilung 11 Uhr 45, beinahe 1 Stunde später, als im normalen Seewasser, und in (c) überhaupt nicht statt. Daß die Menge des Wassers und der intracellulare Druck bei diesen Experimenten mit der Konzentration variierte, konnte aus der Form der

Furchungskugeln ersehen werden. Im normalen Seewasser und noch mehr im Seewasser, welches ein wenig durch den Zusatz von 10—20 % Süßwasser verdünnt wurde, waren die ersten beiden Furchungszellen beinahe vollkommene Halbkugeln. Im Seewasser von höherer Konzentration erhielten die zwei ersten Furchungskugeln eine ellipsoide Gestalt, die sich mit der höheren Konzentration immer mehr der Kugelform näherte. Wenn ich mehr als 2 g NaCl auf 100 ccm dem Seewasser zusetzte, fand in wenigen Stunden Plasmolysis statt und die Oberfläche des Protoplasmas begann unregelmäßig zu schrumpfen. Aber durch Zurückbringen der Eier in normales Seewasser, wurde die normale Form in wenigen Minuten wieder hergestellt.

2. Weitere Forschungen über diesen Gegenstand führten mich zu einer andern Reihe von Tatsachen, welche, wie ich glaube, die physiologische Erklärung für einige Erscheinungen der Furchung geben. In meinen Forschungen über die Regeneration und das Wachstum der Hydroiden, fand ich, daß eine Salzlösung, welche gerade genug konzentriert ist, um die Regeneration und das Wachstum zu verhindern, keineswegs die Hydroiden tötet, oder auch nur die Kraft des Wachstums und der Regeneration zerstört. Die Hydroiden, welche mehrere Tage in einer solchen Lösung gewesen waren, begannen zu regenerieren und zu wachsen, sobald sie in normales Seewasser

zurückgebracht wurden. Als ich dieselben Experimente mit befruchteten Eiern machte, waren die Resultate dieselben. Eine Salzlösung, welche gerade konzentriert genug ist, um Furchung zu verhindern, vernichtet nicht sogleich die Furchungsfähigkeit. Ich fand aber, als ich solche Eier in normales Seewasser zurückbrachte, daß die Art und Weise der Furchung sich in auffallender Weise verändert, entsprechend der Zeit, welche die Eier in konzentriertem Seewasser zugebracht hatten.

3. Ich befruchtete die Eier der Seeigel Vormittags 9 Uhr 30, um 9 Uhr 43 wurde ein Teil dieser Eier in Seewasser gelegt, dem 2 g NaCl auf 100 ccm hinzugefügt waren. Der Rest der Eier blieb im normalen Seewasser. Ich werde das Seewasser, welchem 2 g NaCl auf 100 ccm zugesetzt waren, die konzentrierte Lösung nennen und die Eier, welche demselben ausgesetzt waren, plasmolysierte Eier. Um 10 Uhr 20, ehe selbst in dem normalen Seewasser irgend eine Furchung stattgefunden hatte, nahm ich eine Anzahl Eier aus der konzentrierten Lösung und brachte sie in normales Seewasser zurück. Um 10 Uhr 33 fingen diese Eier an sich zu furchen. Die Furchung war eine normale, da nur Teilung in zwei Zellen stattfand. Zur gleicher Zeit war die Teilung beinahe bei allen normalen Eiern eingetreten. Der einzige Unterschied zwischen den normalen und den plasmolysierten Eiern war, daß die ersteren um 10 Uhr 33 beinahe alle geteilt waren, während von den

letzteren nur ein kleiner Teil die Furchung durchgemacht hatte. Jedoch 10 Minuten später war jedes zweite der plasmolysierten Eier geteilt, meistens in zwei, ausnahmsweise in vier Teile. Aber jetzt begann sich die Sachlage zu verändern. Zu dieser Zeit fingen die normalen Eier an das vierzellige Stadium zu erreichen, und jetzt begannen viele der plasmolysierten Eier, welche sich noch nicht in zwei Zellen geteilt hatten, sich sofort in drei oder vier Zellen zu teilen, ohne immer das zweizellige Stadium durchzumachen. Die Teilung fand in der Weise statt, daß zu gleicher Zeit oder kurz nacheinander kugelförmige Vorsprünge auf der Oberfläche des Eies erschienen, die zuerst zusammenhängend waren, aber bald, zu gleicher Zeit oder rasch nacheinander, getrennt wurden. Diese Art der Teilung scheint mit derjenigen identisch zu sein, welche O. und R. Hertwig unter andern Umständen beobachtet und als „Knospenfurchung“ [1]) beschrieben haben. Die weitere Teilung war dieselbe in den plasmolysierten und in den normalen Eiern.

Um 11 Uhr brachte ich eine zweite Portion von Eiern aus der konzentrierten Lösung in normales Seewasser zurück. Diese Eier zeigten nicht die geringste Spur von Furchung. Um 11 Uhr 22 fingen die Eier an sich zu teilen, aber kaum in irgend einem Falle teilte sich das Ei in zwei, sondern beinahe alle von ihnen teilten sich sogleich in mehrere Furchungszellen.

[1]) O. u. R. Hertwig. Jenasche Zeitschrift, Bd. 20 (1887).

Zahl und Größe der Furchungskugeln war nicht ganz regelmäßig. Meistens waren vier Kügelchen in einem Ei, jedoch bisweilen 5 bis 8. Die Größe der einzelnen Furchungskugeln desselben Eies variierte, die kleinsten hatten ungefähr die Größe einer Blastomere des achtzelligen Stadiums, die größten diejenige eines zweizelligen Stadiums. Um 11 Uhr 44 war die erste Teilung vollendet, und von jetzt an vollzog sich die Furchung vollkommen regelmäßig. Um 11 Uhr 40 waren die normalen Eier im achtzelligen Stadium.

2 Uhr 40 brachte ich eine andere Anzahl Eier aus der konzentrierten Lösung in normales Seewasser zurück. Kein Ei zeigte Furchung. 2 Uhr 50 begann dieselbe. Gerade wie vorher um 11 Uhr teilte sich auch jetzt kaum ein Ei in zwei Furchungszellen. Aber während die meisten der um 11 Uhr beobachteten Eier sich in 4—8 Zellen teilten, zerfielen jetzt die Eier sofort in acht bis sechzehn Furchungszellen. Die Zahl und Größe derselben variirte wieder in den verschiedenen Eiern, aber das auffallende war diesmal das Vorherrschen der Blastomeren von der Größe des 16zelligen Stadiums. Die normalen Eier waren zu dieser Zeit in dem Morula-Stadium. 4 Uhr 5 wurde eine andere Anzahl von Eiern aus der konzentrierten Lösung in normales Seewasser zurückgebracht. Nicht ein Ei hatte sich geteilt. Jedoch 20 Minuten später waren beinahe alle Eier in der Furchung begriffen. Dieses Mal jedoch teilten sie sich nicht in 16, sondern

sogleich in viel mehr Teile. Ich glaube, daß die meisten Eier ungefähr 30 Furchungszellen aufwiesen. Natürlich fand ich auch hier, wie früher, Furchungskugeln von sehr verschiedener Größe in demselben Ei. 6 Uhr 50 wiederholte ich dasselbe Experiment, indem ich eine Anzahl von Eiern aus der konzentrierten Lösung nahm und sie in normales Seewasser zurückbrachte. Kein Ei zeigte eine Spur von Teilung, aber in sehr kurzer Zeit, nach ungefähr 20 Minuten, teilten sich die Eier sogleich in eine große Zahl von kleinen Furchungskügelchen; die kleinsten und zahlreichsten hatten ungefähr die Größe einer Blastomere des 64zelligen Stadiums. Ich wiederholte das Experiment wohl zwanzigmal immer mit demselben Resultat, das in wenigen Worten folgendermaßen ausgedrückt werden kann: Wenn wir befruchtete Eier in Seewasser von einer gewissen höheren Konzentration bringen, findet keine Teilung statt, aber wenn wir sie in normales Seewasser zurückbringen, so teilen sie sich nach ungefähr 20 Minuten direkt in beinahe, wenn auch nicht ganz, so viele Furchungskugeln, wie sie um diese Zeit enthalten würden, wenn sie ununterbrochen im normalen Seewasser geblieben wären. Es muß jedoch hinzugefügt werden, daß die normalen Eier in diesem Experiment den plasmolysierten, in Bezug auf ihr Teilungsstadium, stets voraus sind, und daß ihr Vorsprung um so auffälliger wird, je weiter sie sich entwickeln.

Nachdem Eier 12—24 Stunden in konzentrierter Lösung gewesen sind, teilen sie sich gar nicht, wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht werden. Alle diese Experimente gelingen um so leichter, je besser das Material ist.

4. Ich variirte diese Experimente dadurch, daß ich zuweilen befruchtete Eier sogleich nach der Befruchtung, manche dagegen erst später, in die konzentrierte Lösung brachte. Der Erfolg blieb im ganzen derselbe, und ich will nicht bei den Einzelheiten dieser Experimente verweilen. Aber die folgende Tatsache ist vielleicht von Interesse: Ich befruchtete die Eier im normalen Seewasser und ließ sie darin, bis sie alle im zweizelligen Stadium waren. Dann brachte ich sie in die konzentrierte Lösung. Die Furchung hörte sofort auf. Nachdem sie 3 Stunden darin gewesen waren, brachte ich sie wieder in normales Seewasser zurück, und jetzt teilte sich jede Blastomere sofort in mehr als 2, bisweilen in 8 oder noch mehr Teile.

5. Ich zog aus den vorhergehenden Experimenten den Schluß, daß in der konzentrierten Lösung eine Teilung der Kerne stattfinden könnte, ohne irgend eine Teilung des Protoplasmas. Eier, welche in normalem Seewasser befruchtet worden waren, wurden in die konzentrierte Lösung gebracht und sorgfältig beobachtet. Eine Teilung des Protoplasmas fand nicht statt; aber der Kern teilte sich in der Tat, zuerst in zwei Teile, dann folgten weitere Teilungen.

Ferner versuchte ich zu sehen, ob das Protoplasma solcher Eier, wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht waren, sich in ebenso viele Furchungskugeln teilte, als wie Kerne vorher gebildet worden waren. Und in der Tat beobachtete ich, daß jeder Kern der Mittelpunkt eines der Teile wird, welche später Furchungskugeln werden. Dr. Conklin war so gütig, einige der Eier, welche einige Zeit in der konzentrierten Lösung gewesen waren, und keine Spur von Teilung zeigten, zu färben. Einige dieser gefärbten Eier zeigten sehr deutlich 4 bis ungefähr 30 abgesonderte Kerne. In andern Eiern war die Teilung des Kerns nicht so vollkommen. Alsdann schien der Kern, außerordentlich vergrößert, aus mehreren Teilen zu bestehen, die jedoch noch miteinander verbunden waren. Diese Eier waren zu einer Zeit getötet worden, als die Eier derselben Portion, welche die ganze Zeit in normalem Seewasser geblieben waren, sich im 64zelligen Stadium befanden.

6. Fol und O. und R. Hertwig fanden, daß bei Polyspermie das Ei sich sogleich in ebensoviele Zellen teilt, als wie Teilungsfiguren (Aster) vorhanden sind. Wir wissen, daß es keinen Unterschied für die Teilung des Protoplasmas macht, ob die Kerne ausschließlich von den männlichen Vorkernen abgeleitet sind, wie in dem Falle der Befruchtung eines kernlosen Eies, oder ob von den konjugierten Kernen, wie normaler Weise, oder ob von den konjugierten Kernen und

den männlichen Vorkernen wie in einigen von Fol beschriebenen Fällen. In meinen Experimenten wurden die Eier unter normalen Bedingungen befruchtet, Fälle von Polyspermie waren hierbei sehr selten. Beinahe alle Eier, die im normalen Seewasser blieben, teilten sich ganz normal. Aber ich dachte an die Möglichkeit, daß in der konzentrierten Lösung neue Spermatozoen in das befruchtete Ei eindringen könnten. Ich wußte, daß eine solche Annahme im Gegensatz zu allen bekannten Tatsachen stand, aber diese Tatsachen sind noch sehr spärlich. Wenn eine Polyspermie in meinen Experimenten stattfand, konnte das nur in der konzentrierten Lösung geschehen, insofern nur hier eine Vermehrung der Kerne beobachtet wurde. Aber ich fand, daß die Spermatozoen vollkommen gelähmt wurden, so bald sie in die konzentrierte Lösung gebracht wurden, d. h. in das Seewasser, welchem 2 g NaCl auf 100 ccm zugesetzt waren. Ferner konnte ich zeigen, daß in dieser konzentrierten Lösung keine Befruchtung vollzogen wird. Ich brachte unbefruchtete Eier in die konzentrirte Lösung und fügte Spermatozoen hinzu. Als ich sie wieder in das normale Seewasser zurückbrachte, dauerte es länger bis die Teilung begann, als bei normalen Eiern in normalem Seewasser von dem Augenblick der Befruchtung bis zum Augenblick der Teilung. Die in der konzentrierten Salzlösung zurückgehaltenen Spermatozoen wurden einige Minuten, nachdem sie in das normale Seewasser zurückgebracht

worden waren, wieder lebhaft und drangen dann in die Eier ein. In diesem Falle konnte Polyspermie beobachtet werden, jedoch nicht als Regel. Die meisten dieser Eier teilten sich in zwei Zellen. Aber es war erstaunlich, wie bald unter diesen Umständen die Spermatozoen ihre Befruchtungskraft verloren. Spermatozoen, welche nur wenige Stunden in der konzentrirten Lösung gewesen waren, befruchteten nur $^1/_{1000}$. Teil oder noch weniger von den normalen Eiern, als sie in normales Seewasser zurückgebracht waren, während Spermatozoen desselben Tieres, die im normalen Seewasser geblieben waren, zu derselben Zeit alle Eier eines Weibchens befruchteten. Als ich versuchte im normalen Seewasser Eier zu befruchten, welche einige Stunden in der konzentrierten Lösung mit Spermatozoen geweilt hatten, die sich unter denselben Bedingungen befanden, fing ungefähr nur ein Ei von einer Million an Spuren von Teilung zu zeigen, und regelmäßig blieb diese Teilung in statu nascendi, d. h. sie wurde nicht vollendet. Alle diese Beobachtungen sind ganz verschieden von dem oben beschriebenen Phänomen. Eier, die im normalen Seewasser befruchtet und in die konzentrierte Lösung gelegt wurden, teilten sich ohne Ausnahme, nachdem sie 10—20 Minuten in das normale Seewasser zurückgebracht worden waren, und besaßen die Fähigkeit, sich zu normalen Blastulae und Plutei zu entwickeln. Ja, Eier dieser Art waren noch imstande

sich zu normalen Larven zu entwickeln, nachdem sie in der konzentrierten Lösung 4—6 Stunden gewesen waren. Aber Eier, welche vor der Befruchtung mit Spermatozoen zusammen in die konzentrierte Lösung gelegt und 4—6 Stunden später in normales Seewasser zurückgebracht worden waren, erreichten nur die ersten Furchungsstadien, wenn sie sich überhaupt teilten, dann hörte die Entwickelung auf. Ich habe niemals eine lebendige Larve von diesen Eiern erhalten. Aus all diesen Tatsachen schließe ich, daß die fortwährende Vermehrung der Kerne der befruchteten Eier in der konzentrierten Lösung nicht der Polyspermie zukam, sondern einfach durch Teilung des Kernes bewirkt wurde. Bei diesen Experimenten sind bakteriologische Vorsichtsmaßregeln notwendig, da das Wasser des Aquariums leicht eine Menge von Spermatozoen enthalten kann.

7. In obigem glaube ich gezeigt zu haben, daß bei befruchteten Eiern des Seeigels, welche in konzentrierteres Seewasser gebracht wurden — wir fügten 2—2, 4 g NaCl auf 100 ccm Seewasser hinzu — die Teilung des Kernes sich fortsetzt, obgleich langsamer als unter normalen Bedingungen, während keine Teilung des Protoplasmas möglich ist. Die Tatsache an sich ist von einigem technischen Wert, insofern sie uns in den Stand setzt zwei Prozesse voneinander zu scheiden, welche die Natur gewöhnlich zusammen hervorbringt, und die wir bisher nicht beliebig voneinander

trennen konnten. In Bezug auf unser Wissen über die Teilung, sehen wir hieraus, daß die physiologischen Bedingungen für die Teilung des Kernes von den physiologischen Bedingungen für die Teilung des Protoplasmas verschieden sind. Wir wissen jetzt in dieser Hinsicht mit Sicherheit, daß unter denselben Bedingungen der Kern fortfährt sich zu teilen, unter welchen das Protoplasma nicht die geringste Spur von Teilung zeigt. Diese Experimente erlauben uns sogar einen Schritt weiter zu gehen und ein Element in dem Komplex, welchen man Teilung nennt, nämlich die physiologische Ursache für die Teilung des Protoplasmas klar zu legen. Wir sahen, daß das Protoplasma sich in der konzentrierten Lösung nicht teilte, während es, sobald es in das normale Seewasser zurückgebracht worden war, sich sogleich in ungefähr ebenso viele Furchungskugeln teilte, wie Kerne gebildet waren. Alle weiteren Schlüsse hängen von unserem Wissen über die Wirkung der Salzlösungen auf Protoplasma ab. Ich selbst habe diesen Punkt erforscht und andere veranlaßt sich mit dieser Frage zu beschäftigen. Das Resultat aller bis hierher fortgesetzten Forschungen ist folgendes: Die Verstärkung der Konzentration der Salzlösung, in welcher ein Tier oder ein Gewebe lebt hat dieselbe Wirkung, wie das Vermindern der Temperatur. Das Verringern der Konzentration hat qualitativ und quantitativ dieselbe Wirkung, wie das Erhöhen der Temperatur.

Ich will zwei Fälle anführen, um dies zu erläutern, 1. ein Beispiel, um den Parallellismus der erwähnten Wirkung der Temperatur und der Konzentration in qualitativer Hinsicht zu zeigen. Es ist mir kürzlich gelungen, Tiere, welche verschiedenen Klassen angehören — Larven von Polygordius, Copepoden etc. — positiv heliotropisch zu machen, indem ich sie in niedrige Temperaturen brachte, und negativ heliotropisch, indem ich die Temperatur des Wassers erhöhte. In Wasser von 0° bis ungefähr 10° sind z. B. Larven von Polygordius ausschließlich positiv heliotropisch. In Wasser von über 25° sind sie ausschließlich negativ heliotropisch. Aber durch Hinzufügung eines gewissen Quantums von NaCl zum normalen Seewasser, war ich im Stande sie ebensowohl positiv heliotropisch zu machen, und durch Hinzufügung eines gewissen Quantums von Süßwasser zu dem normalen Seewasser, konnte ich sie negativ heliotropisch machen. Dasselbe war der Fall bei Copepoden, nur die absoluten Zahlen waren verschieden, wie erwartet werden konnte. Wenn wir lebendes Gewebe in eine Lösung höherer Konzentration bringen, verringern wir die Reizbarkeit, indem wir die Menge des in ihnen enthaltenen Wassers verringern. Unter Verminderung der Reizbarkeit verstehen wir, daß die Wirkung, welche durch dieselbe Ursache bestimmt wird, quantitativ geringer ist. Dies erklärt wie die Teilung des Protoplasmas im

allgemeinen begrenzt ist, warum in einer Lösung von einer gewissen Konzentration keine Teilung des Protoplasmas stattfindet, und warum das Protoplasma, wenn es in das normale Seewasser zurückgebracht wird, sich sogleich in ebenso viele Furchungskugeln teilt, als wie Kerne vorgebildet worden sind. Die Teilung des Protoplasmas ist die Wirkung eines Reizes, den der Kern auf das Protoplasma ausübt und der verursacht, daß das Protoplasma sich um den Kern schließt. Wenn wir das befruchtete Ei in die konzentrierte Salzlösung bringen (2 g NaCl auf 100 ccm. Seewasser), teilt sich der Kern und jeder Kern übt einen Reiz auf das Protoplasma aus, mit welchem er in Berührung kommt. Aber da das Protoplasma des Eies verhältnismäßig zu wenig Wasser enthält, befindet es sich in der Lage eines erkalteten Muskels, welcher nicht auf den Nervenreiz reagiert und so kommt es zu keiner Teilung des Protoplasmas. Aber so bald wir das Ei in das normale Seewasser zurückbringen, nimmt das Protoplasma sehr schnell Wasser auf und erlangt seine Reizbarkeit wieder und jetzt reagiert es natürlich auf die Reizungen der Kerne und schließt sich um jeden Kern der Teilstücke. Wenn wir eine kleinere Dosis von NaCl zusetzen, — nämlich 1,3 g NaCl auf 100 ccm Seewasser — ist die Reizbarkeit nur ein wenig geringer, als die normale, und die ganze Wirkung ist, daß die Reaktionen des Protoplasmas nur etwas lang-

samer sind und ein wenig verzögert werden. Welcher Art das Reizmittel ist, und von welchem Teil des Kernes es ausgeübt wird, können wir nicht sagen. Andere Tatsachen machen mich geneigt zu glauben, daß dieser Reiz ein chemischer ist und durch gewisse in dem Kern erzeugte Substanzen verursacht wird, welche auch wirksam sein können, wenn sie von dem Kern getrennt sind.

8. Die physiologischen Ursachen der Teilung des Kernes sind bei diesen Experimenten nicht direkt berührt worden. Aber zwei Punkte müssen erwähnt werden, 1. daß die Teilung des Kernes in der konzentrierten Lösung (2 g NaCl auf 100 ccm Seewasser) verzögert wurde und zuletzt nach 12 bis 24 Stunden ganz aufhörte; 2. daß die Teilung des Kernes außerordentlich unregelmäßig war, wenn das Protoplasma an der Teilung keinen tätigen Anteil nahm. Wir ersehen aus diesen Tatsachen einige Einflüsse, welche das Protoplasma auf die Teilung des Kernes ausübt. Dieser Einfluß kann in der Weise ausgeübt werden, daß durch den hohen intrazellulären Druck, welcher im normalen Zustande in den Furchungskugeln existiert, diese sich einander pressen und abflachen. Die Form der Zelle bestimmt jedoch, wie Sachs schon lange gezeigt hat, die Orientierung der Teilungsebene und zwar, wie Hertwig glaubt, in der Weise, daß die Längsachse der „Kernspindel" in den längsten Durchmesser der Zelle fällt. Deshalb müßten wir erwarten,

daß innerhalb gewisser Grenzen mit vermehrtem intrazellulären Druck das Gesetz von Sachs über die rechtwinkelige Teilung der Furchungsebene deutlicher werden würde. Ich fand in der Tat, daß im normalen und noch mehr im etwas verdünnten Seewasser, wo der Turgor und infolgedessen die Abflachungen der Furchungskugeln am größten war, das Gesetz von Sachs sich am genausten verwirklichte. Deshalb muß die geometrische Regelmäßigkeit in der Teilung des Kernes, welche unter normalen Bedingungen so auffallend ist, sogleich verschwinden, wenn das Protoplasma sich nicht an der Furchung beteiligt.

9. Unsere Beobachtungen inbetreff der Abhängigkeit der Reizbarkeit des Protoplasmas von dem in den Geweben enthaltenen Wasser, fügt noch eine Tatsache zu den bereits gegebenen hinzu, welche die Wichtigkeit des Wassers für alle Prozesse des Wachstums und der Entwicklung zeigt. Wenn wir die Menge des Wassers in einem regenerierenden oder wachsenden Gewebe vermindern, verzögern oder verhindern wir nicht bloß diese Prozesse durch Reduzierung des Volums der Zellen und der mechanischen Wirkungen des intrazellulären Druckes, sondern wir vermindern auch die Reizbarkeit des Protoplasmas. Diese Reizbarkeit spielt, wie wir sahen, eine wichtige Rolle in dem Prozeß der Teilung, und da Regeneration und Wachstum eine Funktion des Prozesses der Teilung

ist, verstehen wir sogleich, warum Regeneration und Wachstum verzögert oder beschleunigt werden müssen, wenn wir Hydroidpolypen in konzentrierteres oder verdünnteres Seewasser bringen. Wenn nun diese Schlußfolgerung richtig ist, so ist unser Experiment nicht bloß für den Prozeß der Teilung von Eiern, sondern auch für Zellen im allgemeinen gültig.

Die Experimente, welche in dieser Arbeit erwähnt sind, wurden alle an Seeigeln (Arbacia) vorgenommen.

Das Hauptresultat dieser Forschungen ist kurz folgendes: Wenn wir die Reizbarkeit des Ei-Protoplasmas vermindern, indem wir die Wassermenge desselben verringern, kann sich der Kern ohne Teilung des Protoplasmas teilen. Wenn wir wiederum später die Menge des Wassers, und infolgedessen die Reizbarkeit eines solchen Eies vermehren, teilt sich das Protoplasma sogleich in ebenso viele Furchungskugeln, wie vorher Kerne gebildet wurden. Die Teilung des Protoplasmas in dem Ei und wahrscheinlich in jeder Zelle ist mehr die Wirkung eines Reizes, welcher in der Regel von den Kernen ausgeübt wird.

II.

Über die Natur des Befruchtungsprozesses und die künstliche Erzeugung von normalen Larven (Plutei) aus den unbefruchteten Eiern des Seeigels[1]).

1. Frühere Forschungen haben mich zu der Vermutung geführt, daß Veränderungen in dem Aggregatzustand der Materie (Verflüssigung und Festwerden) eine wichtige Rolle in der Mechanik der Lebenserscheinung spielen könnten. Während ich die Absorption von Flüssigkeiten durch die Muskeln studierte, fand ich, daß allem Anschein nach eine $\frac{n}{8}$ Lösung[2]) von $CaCl_2$ die Bildung von festen Substanzen in dem Muskel begünstigt, während eine äquimolekulare Lösung von KCl vielmehr die Bildung von mehr flüssigen Verbindungen befördert. Die Na-Ionen lassen sich zwischen K- und Ca-Ionen einreihen. Bei diesen Erscheinungen hängt jedoch viel von der Konzentration der Salze ab. Wir wissen, daß die Enzyme der Ge-

[1]) American Journal of Physiology, Vol. III (1. Oktober 1899) S. 135.

[2]) Ich schlage vor in Zukunft durch $\frac{n}{8}$ Lösung von NaCl die 0,7 % Lösung zu ersetzen. Es ist Zeit, daß wir die Prozent-Lösungen in der Physiologie aufgeben.

rinnung und der Verflüssigung in ihrer Wirkung sehr von den Ca-, Na-, K- und Mg-Ionen beeinflußt werden. Ca begünstigt die Koagulation und Mg tut das Gegenteil. Zwischen diese beiden stellen sich die zwei anderen Ionen. Auch in diesem Falle hängt viel von der Konzentration ab.

Ich habe eine Reihe von Versuchen über die Mechanik der Lebenserscheinungen angestellt, die bald in dieser Zeitschrift veröffentlicht werden sollen. Jetzt möchte ich nur einen Teil dieser Versuche behandeln, nämlich denjenigen, welcher sich auf die Natur des Befruchtungsprozesses bezieht.

Ich fand, daß bei $\frac{5}{8}$ n-Lösungen[1]) von $CaCl_2$, NaCl, KCl und $MgCl_2$ die Teilung der befruchteten Eier der Seeigel (Arbacia) am besten in $MgCl_2$ sich vollzieht, danach in KCl, während $CaCl_2$ sich als das Schädlichste in dieser Reihe herausstellte.

Vor sieben Jahren fand ich und später Norman, daß eine Teilung des Kernes ohne Teilung des Protoplasmas stattfindet, wenn die Konzentration des Seewassers durch den Zusatz gewisser Salze genügend verstärkt ist. Wenn jedoch solche Eier in normales Seewasser zurückgebracht werden, teilen sie sich in ebenso viele Zellen wie vorher Kerne gebildet sind. Dieses Jahr versuchte ich die Wirkungen der äquimolekularen Lösungen von $MgCl_2$, KCl, NaCl, und $CaCl_2$ auf diesen Prozeß der Kernteilung (in welchem

[1]) Ganz nahe der Konzentration des Seewassers.

die Kernmembran augenscheinlich verflüssigt ist) und fand, daß der Einfluß der vier Salze (oder besser Kationen) der obenerwähnten Ordnung folgte.

Wir wissen, daß Enzyme in der Regel einen leichten Grad von Azidität oder Alkalinität für ihre Tätigkeit erfordern. Voriges Jahr zeigte ich, daß der Zusatz einer kleinen Menge von H-Ionen zum Seewasser die Teilung verzögert oder verhindert, während eine kleine Menge HO-Ionen die Entwicklung des Arbacia-Eies begünstigt und beschleunigt.

2. Es ist seit einiger Zeit bekannt, daß unbefruchtete Eier der Echinodermen, Würmer und Arthropoden sich zu teilen beginnen, wenn sie verhältnismäßig lange Zeit im Seewasser gelassen werden. Dies wird im allgemeinen als eine pathologische Erscheinung betrachtet. Mead gelang es durch Zusatz einer sehr kleinen Menge von KCl zum Seewasser die Bildung von Polkörperchen im unbefruchteten Ei eines Meerwurmes Chaetopterus zu verursachen. Morgan versuchte die Wirkung konzentrierteren Seewassers auf unbefruchtete Eier von Seeigeln mit ähnlichem Erfolg, wie ich früher mit derselben Methode bei befruchteten Eiern hatte. Wenn die unbefruchteten Eier aus dem konzentrierteren Seewasser in normales Seewasser zurückgebracht werden, trennen sie sich in ebenso viele Zellen, wie vorher Kerne in der konzentrierteren Lösung gebildet worden sind. Aber in keinem dieser Fälle führten die Zellteilungen der un-

befruchteten Eier zur Bildung einer Blastula. Es wurde ein Haufen von Zellen, höchstens ungefähr 60 gebildet und dann hörte alles auf. Wir können diese Beobachtungen für die Theorie der Befruchtung nicht benutzen, aus dem einfachen Grunde, weil das wesentliche Element des Befruchtungsprozesses, nämlich die Bildung eines Embryo fehlt. Bei Geschwülsten oder Gallenbildungen kennen wir Zellbildungen und sogar Wachstum, und doch führen diese Zellbildungen nicht zur Bildung eines Embryos.

3. Kürzlich angestellte Beobachtungen brachten mich auf den Gedanken, daß etwas in der Beschaffenheit des Seewassers die unbefruchteten Eier von Seetieren an parthenogenetischer Entwicklung hindern möchte. Voriges Jahr fand ich, daß die quergestreiften Muskeln eines Frosches sich rhythmisch zusammenzogen (wie das Herz), wenn sie in eine $\frac{n}{8}$ NaCl oder NaBr Lösung gelegt wurden. Nur die Gegenwart von K- und Ca-Ionen im Blute verhindert die quergestreiften Muskeln sich rhythmisch im Körper zusammenzuziehen. Romanes beobachtete, daß wenn der Rand (mit dem Nervenring) von Hydromedusen abgeschnitten wird, sich das Mittelstück nicht länger rhythmisch zusammenzieht. Diesen Sommer fand ich, daß dies allein der Gegenwart von K- und Ca-Ionen im Seewasser zuzuschreiben ist. In einer $\frac{5}{8}$ n Lösung von NaCl oder noch besser von NaBr fährt das Mittelstück fort sich spontan zusammenzuziehen. Indem ich diese und meine

neueren Beobachtungen über den relativen Einfluß der verschiedenen Ionen auf die Teilung auf das Problem der künstlichen Parthenogenesis anwende, scheint es mir, daß bei Vornahme von zwei Änderungen in der Beschaffenheit des Seewassers die Eier des Seeigels, ohne befruchtet zu sein, imstande sein könnten, vollkommene Embryonen zu erzeugen. Diese Änderungen sind entweder eine Verminderung der Na und Ca-Ionen oder eine Vermehrung der Mg- (oder K-)Ionen oder beides. Ich denke, daß eine große Anzahl von Variationen in diesem Sinne die gewünschte Wirkung hervorbringen könnten, aber das Ende der Jahreszeit erlaubte mir nur eine begrenzte Zahl von Variationen zu versuchen. Ohne in Einzelheiten zu gehen (welche für den ausführlichen Bericht vorbehalten werden mögen) will ich kurz erwähnen, daß die Mischung von ungefähr 50% $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ mit ungefähr 50% Seewasser imstande war, ungefähr dieselbe Wirkung hervorzubringen, wie das Eindringen eines Spermatozoon[1]). Die unbefruchteten Eier wurden in einer solchen Lösung ungefähr zwei Stunden gelassen. Als sie in normales Seewasser zurückgebracht waren, begannen sie sich zu teilen und Blastulae, Gastrulae und Plutei, welche in

[1]) Die nachfolgenden Experimente bewiesen, daß die Verstärkung der Konzentration des Seewassers die Entwicklung der Eier verursachte. Ich vermutete diese Möglichkeit, wurde aber durch einen Irrtum in der Präparation der Lösungen irre geführt (welche ich andern anvertraut hatte). Dieser Irrtum wurde später entdeckt und berichtigt (1903).

jeder Beziehung normal waren, zu bilden. Der einzige Unterschied war, daß weniger Eier entwickelt wurden, und daß ihre Entwicklung langsamer war, als in dem Falle der normalen Entwicklung der befruchteten Eier. Bei jedem Experiment wurde eine Reihe von Kontrollversuchen vorgenommen, um die Annahme der möglichen Anwesenheit von Spermatozoen im Seewasser auszuschließen. Unbefruchtete Eier desselben Weibchens wurden in normales Seewasser und in Lösungen mit nur wenig $MgCl_2$ gebracht. Weder im normalen Seewasser noch in irgend einer dieser Lösungen mit nur wenig $MgCl_2$ entwickelte sich ein einziges Ei zu einer Blastula oder zeigte selbst nach langer Zeit irgend etwas mehr als den Beginn einer Furchung.

4. Aus diesen Experimenten folgt, daß das unbefruchtete Ei des Seeigels alle wesentliche Elemente für die Erzeugung eines vollkommenen Pluteus enthält. Die einzige Ursache, welche die Seeigel verhindert, sich unter normalen Bedingungen parthenogenetisch zu entwickeln, ist die Beschaffenheit des Seewassers. Das letztere besitzt entweder keine genügende Menge von Ionen, welche für die Mechanik der Zellteilung nötig sind (Mg, K, HO oder andere) oder es enthält eine zu große Menge von Ionen, welche für diesen Prozeß ungünstig sind (Ca, Na oder andere) oder beides. Alles was das Spermatozoon in das Ei für den Befruchtungsprozeß hineintragen muß, sind Ionen, die dazu da sind, um den

Mangel der einen zu ergänzen oder die Wirkungen der andern Klasse von Ionen im Seewasser zu verhindern, oder beides. Das Spermatozoon kann jedoch außerdem eine Anzahl von Enzymen oder anderen Stoff hinzubringen. Die Ionen und nicht die Nukleine in dem Spermatozoon sind wesentlich für den Prozeß der Befruchtung (was diejenigen interessieren wird, welche mit mir glauben, daß die Physiologen der anorganischen Chemie ein wenig mehr Aufmerksamkeit zollen sollten). Ich zweifle nicht, daß dieselben Grundsätze für den Befruchtungsprozeß anderer, wenn nicht aller Seetiere gültig sind, obgleich die in ihnen enthaltenen Ionen wahrscheinlich bei verschiedenen Arten verschieden sein werden.

Zum Schluß können wir die Frage stellen, ob wir erwarten dürfen, künstliche Parthenogenesis bei Säugetieren erzeugen zu können. Janósik hat Furchung der unbefruchteten Eier von Säugetieren gefunden. Dies ist ähnlich wie die obenerwähnte Tatsache, daß die unbefruchteten Eier der Seeigel Furchung zeigen können, wenn sie lange genug im Seewasser bleiben. Ich halte es für möglich, daß nur die Ionen des Blutes den Beginn der parthenogenetischen Entwicklung der Embryos bei Säugetieren verhindern und ich halte es fernerhin nicht für unmöglich, daß durch eine vorübergehende Veränderung in den Ionen des Blutes auch eine vollständige Parthenogenesis bei Säugetieren zu stande kommen könnte.

III.

Über die Ionen der Eiweißsubstanzen und ihre Rolle in der Mechanik der Lebenserscheinungen. — Der giftige Charakter einer reinen NaCl-Lösung[1]).

I. Einführende Bemerkungen über die Ionen der Eiweißsubstanzen.

In dieser Reihe von Artikeln beabsichtige ich einige neue Tatsachen und Ideen in betreff der Konstitution von lebender Materie zu veröffentlichen, und diese Tatsachen auf eine Anzahl Lebenserscheinungen anzuwenden. Die neuen Tatsachen, welche die Zusammensetzung der lebenden Materie betreffen, sind hauptsächlich folgende: Die Salze oder Elektrolyten existieren im allgemeinen nicht ausschließlich als solche in lebenden Geweben, sondern sind teilweise mit Eiweißen verbunden. Die Moleküle der Salze oder Elektrolyte treten in diese Verbindung nicht als ein Ganzes, sondern durch ihre Ionen ein.

Die große Wichtigkeit dieser Ionen in Eiweißsubstanzen liegt in der Tatsache, daß durch die Substitution eines Ions für ein anderes die physikalischen

[1]) American Journal of Physiology, Vol. III (1900) Seite 327.

Eigenschaften der Eiweißkörper sich verändern (z. B. ihre Fähigkeit Wasser zu absorbieren und ihr Aggregatzustand). Wir besitzen so in diesen Ionen-Eiweißverbindungen wesentliche Bestandteile lebender Materie, welche nach Belieben modifiziert werden können und uns daher befähigen, die Lebenserscheinungen selbst zu variiren und zu kontrollieren.

Als ich Experimente über die Wirkungen der Ionen auf die Wasserabsorption durch den Muskel machte, fand ich, daß ein Muskel in äquimolekularen Lösungen verschiedener Chloride nicht dieselbe Menge Wasser aufnimmt[1]). Die Unterschiede waren sehr auffallend. Während in einer 0,7% NaCl-Lösung der Muskel ungefähr 7% Wasser seines eigenen Gewichtes innerhalb 18 Stunden aufnahm, absorbierte er in einer äquimolekularen KCl-Lösung ungefähr 40—50% Wasser seines eigenen Gewichtes. In einer äquimolekularen $CaCl_2$-Lösung verlor er beinahe 20% Wasser und in einer LiCl-Lösung verlor er weder, noch absorbierte er Wasser. Dasselbe bestätigte sich bei den Bromiden und den Jodiden derselben Metalle. Sogar organische Verbindungen dieser Metalle zeigten mehr oder weniger denselben Unterschied, obgleich die Wirkungen der Anionen in diesen Fällen die Resultate quantitativ modifizierten. Dieser Unterschied zwischen den Wirkungen der verschiedenen Metall-Ionen auf die Absorption des Wassers durch den Mus-

[1]) Studies in gen. phys. Zweiter Teil, S. 510.

kel, zeigt einen bemerkenswerten Parallelismus mit dem Einfluß derselben Ionen auf die Absorption des Wassers durch Seifen. Es gibt Na, K, Ca- und andere Seifen. Während K-Seifen ungeheure Quantitäten Wasser absorbieren, nehmen Na-Seifen viel weniger und die Ca-Seifen noch weniger, als die Na-Seifen auf. Wenn wir in den Na-Seifen K-Ionen für die Na-Ionen substituieren, nimmt die Seife Mengen von Wasser auf. Wenn wir Ca-Ionen an die Stelle von Na-Ionen setzen, verliert die Seife Wasser. Hieraus schloß ich, daß in den Muskeln verschiedene Metall-Ionen in Verbindungen existieren, in welchen sie leicht für einander substituiert werden können, gerade wie in den Seifenverbindungen. Die Muskelsubstanzen sind den Seifenverbindungen in einer physikalischen Eigenschaft ähnlich, nämlich in der Absorption des Wassers. Ich gab der Ansicht Ausdruck, daß die Ionen im Muskel mit Eiweiß verbunden sein müssen. Wenn ein Muskel in eine KCl-Lösung gelegt wird, dringen die K-Ionen der Lösung in den Muskel ein, und nehmen nach und nach die Stelle der Na- und Ca-Ionen in den Metallverbindungen der Eiweißkörper ein. Die K-Eiweiße sind imstande mehr Wasser zu binden, als die Na- oder Ca-Eiweiße. Wenn der Muskel in eine $CaCl_2$-Lösung gelegt wird, werden die Ca-Ionen den Platz der Na- und K-Ionen in den Eiweißsubstanzen des Muskels einnehmen, und der Muskel muß Wasser verlieren. Ich habe diese Experimente noch weiter

geführt und will einige der neuen Resultate in dieser Reihe von Artikeln veröffentlichen.

Zunächst wendete ich diesen Begriff von Ionen der Eiweißsubstanzen auf eine Erscheinung an, welche bis jetzt nur gelegentlich beobachtet worden ist, nämlich die rhythmischen Zusammenziehungen der Muskeln des Skelets. Ich fand, daß solche rhythmische Zusammenziehungen nur in Lösungen von Elektrolyten stattfanden, d. h. in Verbindungen, welche der Ionisation fähig sind. In Lösungen von Nichtleitern (Harnstoffe, verschiedene Zuckerarten und Glyzerin) sind diese rhythmischen Zusammenziehungen unmöglich. Hieraus können wir ersehen, daß sie eine Funktion der Eiweißionen sind. Aber nur in gewissen Ionenlösungen sind solche rhythmischen Zusammenziehungen möglich. Alle Lösungen der Na-Salze sind imstande sie zu erzeugen, aber in einer 0,7% NaCl-Lösung beginnen die Zusammenziehungen später und sind weniger kraftvoll, als in einer äquimolekularen Na Br-Lösung. Dies zeigt an, daß nicht nur die Metall-Ionen die physikalischen Eigenschaften der Eiweiß-Ionen beeinflussen, sondern auch die Anionen es ebensogut tun. Dies dürfte aus der Annahme, daß Anionen sowohl wie Kationen sich mit Eiweißstoffen verbinden können, verständlich sein. Dies zwingt uns die Frage zu stellen, ob beide Ionen sich nicht mit demselben Eiweißmolekül verbinden können, nur mit dem Unterschiede, daß die zwei verschiedenen Ionen

an verschiedenen Stellen in das Molekül eingefügt werden. Mein Kollege Prof. Stieglitz, mit welchem ich diese Frage erörterte, machte mich auf das Verhalten der Amido-Essigsäure aufmerksam, welche in der Tat in ähnlicher Weise wirkt. Aus allem, was wir inbetreff der Beschaffenheit der Eiweißkörper wissen, scheint es gerechtfertigt, anzunehmen, daß einige von ihnen wohl gewisse Eigentümlichkeiten der Amidosäuren teilen dürften[1]).

Die Experimente über die rhythmischen Zusammenziehungen der Skelettmuskeln führten jedoch noch zu einigen anderen Daten inbetreff der Eiweiß-Ionen. — Lösungen von Na-Ionen erzeugen rhythmische Zusammenziehungen nur, wenn die Muskelzellen in genügender Anzahl Ca-Ionen enthalten. Sobald es in den Geweben an Ca-Ionen mangelt, sind die Na-Ionen nicht länger imstande, rhythmische Zusammenziehungen zu verursachen. Wenn wir andererseits Ca oder K-Lösungen zu der NaCl-Lösung hinzufügen, so wird sie nicht länger rhythmische Zusammenziehungen in einem frischen Muskel verursachen. Es hat also den Anschein, als ob die Substitution gewisser Quantitäten von Na-Ionen für Ca-Ionen Zusammenziehungen verursacht. Aber wenn diese Substitution zu weit geht, verliert der Muskel seine Reizbarkeit. Andererseits verhindert die Gegenwart der Ca-Ionen in der NaCl-Lösung die Sub-

[1]) Spiro, Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 28 (1899) S. 174.

stitution einer genügenden Zahl von Na-Ionen für Ca-Ionen und daher werden auch rhythmische Zusammenziehungen des Muskels verhindert. Der Gegenwart von Ca- (und K-) Ionen in unserem Blut verdanken wir es, daß unsere Muskeln sich nicht rhythmisch zusammenziehen.

Diese Tatsachen fanden weitere Unterstützung, als ich die aktive Alkalinität des Blutes zu bestimmen versuchte. Ich hatte gefunden, daß eine geringe Verminderung in der aktiven Alkalinität des Seewassers die Entwicklung und das Wachstum junger Seeigel verzögerte, während eine geringe Vermehrung der Zahl von Hydroxylionen beide Prozesse beschleunigte. Das physiologische Hauptinteresse bezüglich der Alkalinität schien mir in dem osmotischen Druck der freien HO-Ionen im Blut oder Serum zu liegen, da nur freie HO-Ionen irgend welche physiologischen Wirkungen hervorbringen können. Im Laufe meiner Experimente fand ich, daß die Menge von freien HO-Ionen im Blut weder durch einen beträchtlichen Zusatz von NaHO vermehrt, noch durch einen bedeutenden Zusatz von HCl vermindert wird[1]).

Experimente bewiesen, daß dies nicht durch Salze des Blutes oder Serums, sondern durch die Eiweißstoffe bewirkt wird. Es ist augenscheinlich, daß die letzteren sich mit H und HO-Ionen verbinden können.

[1]) Spiro und Pemsel, Zeitschrift für physiologische Chemie, Band 26 (1898) S. 233.

Spiro kam zu einem ähnlichen Resultate, indem er von einem anderen Gesichtspunkt ausging[1]). Auch hier haben wir wieder mit Eiweiß-Ionen zu tun.

Wenn wir diese Erscheinungen von einem biotechnischen Standpunkte betrachten, gewinnen sie an Bedeutung. Sie lehren uns, daß wir einem Gewebe neue Eigenschaften verleihen können, indem wir die Qualität und die relativen Verhältnisse der Ionen in Verbindung mit den Eiweißstoffen verändern. Die charakteristischen Eigenschaften eines jeden Gewebes leiten sich teilweise von der Tatsache her, daß seine Eiweiß-Ionen gewisse Ionen in bestimmten Proportionen enthalten. Jede Veränderung in dieser Proportion wird von einer Veränderung in den Eigenschaften des Gewebes begleitet.

Vor 10 Jahren begann ich mit Experimenten, bei welchen ich nach Belieben ein Organ für das andere substituierte, oder ein Organ in ein anderes verwandelte (Heteromorphose). Die Agentien, welche ich für diesen Zweck gebrauchte, waren verschiedene Arten von Kontakt, Gravitation und Licht. Aber die Zahl der Tiere, bei welchen die Erscheinung

[1]) Die Experimente bestanden darin, daß ich verschiedene Mengen von Säuren oder Alkali dem Ochsenblut zusetzte und prüfte, wie lange der Muskel eines Frosches in einer solchen Lösung lebendig blieb. Während der Zusatz einer kleinen Menge von Säure oder Alkali zu einer physiologischen Salzlösung die letztere für den Muskel giftig macht, ist eine viel größere Säure- oder Alkali-Menge erforderlich, um das Blut für den Muskel giftig zu machen (1903—1906).

der Heteromorphose kontroliert werden konnte, war ziemlich begrenzt. Ich folgerte zu jener Zeit, daß es für die Entwicklung dieser technischen oder „konstruktiven" Seite der Biologie notwendig sein würde, einen mehr elementaren Angriffspunkt zu finden. Die Ionen-Eiweißverbindungen schienen wegen der Leichtigkeit, mit welcher ihre Eigenschaften durch eine Veränderung ihrer Ionen vertauscht werden können, die gewünschte Gelegenheit zu bieten, deshalb beschloß ich vorigen Sommer in Woods Hole ganz den Experimenten in dieser Richtung mich zu widmen. Seetiere, welche in einem Medium leben, das eine hohe Ionenkonzentration besitzt, schienen bessere Gelegenheiten dazu zu bieten als Süßwasser- oder Landtiere.

Ein kurzer Bericht über einen Teil der Sommerarbeit wurde schon in dieser Zeitschrift bekannt gegeben [1]). Seitdem hat Dr. W. Pauli aus Wien eine Arbeit, in der er unabhängig zu ähnlichen Schlüssen über die Eiweiß-Ionen kommt, veröffentlicht [2]).

Seine Schlüsse sind auf Experimente über die physikalischen Eigenschaften der Eiweißkörper begründet. Seine Schrift erschien zu spät, um mich in

---

[1]) American Journal of Physiology, Band III S. 135.

[2]) W. Pauli, Über physikalisch-chemische Methoden und Probleme in der Medizin (Wien, 1900) und „Über die physikalischen Zustandänderungen der Eiweißkörper" Wiener Akademischer Anzeiger (den 12. Oktober, 1899).

meiner Arbeit oder meinen Ideen zu beeinflussen, aber die Klarheit seiner Resultate und Darlegungen waren mir eine sehr willkommene Unterstützung. Er spricht in seiner Schrift über die Ionen der Eiweißsubstanzen, und ich brauche nur den folgenden Satz anzuführen, um zu zeigen, inwiefern seine Vorstellungen mit den meinigen übereinstimmen: „Wir können die allgemeine Existenz der Ionen der Eiweißsubstanzen im lebenden Organismus nicht bezweifeln. Wir haben sogar dringende Gründe, anzunehmen, daß alle Eiweißkörper des Protoplasmas dort nur in Verbindung mit Ionen existieren." Ich werde die Gelegenheit, seine Ansichten weiter zu erörtern wahrnehmen, wenn der volle Bericht über seine Experimente, welchen er in Aussicht stellt, erscheint.

Diese einführenden Bemerkungen mögen für jetzt genügen. Ich werde nun über eine Reihe von Experimenten berichten, welche mit der Annahme der Existenz von Eiweiß-Ionen, und der Möglichkeit die Eigenschaften der Gewebe durch Umtausch der relativen Proportionen der Ionen in den Geweben zu verändern, unternommen wurden.

II. Experimente an Fischen.

Wenn es wahr ist, daß die Lebenserscheinungen von der Gegenwart einer Anzahl von verschiedenen in bestimmten Proportionen vorhandenen Metallverbindungen des Eiweißes (Na, Ca, K und Mg) ab-

hängen, so folgt daraus, daß Lösungen, die nur eine Klasse von Metall-Ionen enthalten, als Gift wirken müssen. Der Grund dafür ist, daß die eine Klasse der Metall-Ionen alsdann nach und nach den Platz der anderen Metall-Ionen in den ionisierten Eiweißkörpern der Gewebe einnimmt. Daher muß sogar eine reine NaCl-Lösung giftig sein, obgleich dieses Salz alle unsere Gewebe durchdringt und der Hauptbestandteil der anorganischen Materie des Ozeans ist. Ich habe vergebens die Literatur durchgesehen, um Tatsachen zu finden, welche diese Ansicht bestätigen. Ich fand nur die folgenden Daten:

Ringer und Locke[1]) erwähnen die Tatsache, daß in NaCl-Lösungen die Kontraktionskurve eines Muskels leichte Variationen zeigen kann, und Locke fügt hinzu, daß dasselbe auch bei gewissen elektrischen Erscheinungen in den Nerven zutrifft. True hat eine andere Beobachtung in dieser Richtung beigebracht. Seit vielen Jahren ist es bekannt, daß Pflanzenzellen z. B. Spyrogyra, wenn sie in eine sehr konzentrierte Salz- oder Zuckerlösung gelegt werden, Wasser verlieren und aufhören zu wachsen. True fand, daß der osmotische Druck einer $NaNO_3$ und KNO_3-Lösung, die gerade imstande ist, das Wachsen bei Spyrogyra zu verhindern, geringer ist, als derjenige einer Zuckerlösung, welche das Wachsen unmöglich macht. Daraus folgert

[1]) Locke, Archiv für die gesamte Physiologie, Band 54 (1893), S. 501.

er, daß $NaNO_3$ nicht gleichgültig für Spyrogyra ist[1]). In diesem Falle war natürlich die Konzentration der Na-Ionen viel größer, als im Blut oder Seewasser. Es ist jedoch leicht, eine treffende Erklärung für die Tatsache, daß eine reine NaCl-Lösung ein starkes Gift ist, zu geben. In einer früheren Schrift habe ich gezeigt, daß Fundulus, ein Seefisch, eine erstaunliche Verstärkung der Konzentration des Seewassers vertragen kann. Ein Zusatz von 5% NaCl zum Seewasser schadet dem Tiere nichts[2]). Ich wählte dasselbe, um meine Vorstellungen über Metallverbindungen des Eiweiß zu prüfen. Ich fand, daß Fundulus nach kurzer Zeit stirbt, wenn er in eine reine NaCl-Lösung von derselben Konzentration gebracht wird, wie diejenige, in welcher dieses Salz im Seewasser existiert[3]). In $\frac{5}{8}$ n-Lösungen von NaCl, die mit verschiedenen Quantitäten von destilliertem Wasser verdünnt wurden, lebten die Tiere um so länger, je größer die Verdünnung war, und in destilliertem Wasser lebte der junge Fisch unbestimmbare Zeit. Die folgende Tabelle zeigt die Lebensdauer dieser Fische in reinen NaCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen:

---

[1]) True, Botanical Gazette, 1898, S. 407.

[2]) Loeb, Archiv für die gesamte Physiologie, Bd. LV (1894), S. 530.

[3]) Für diese Experimente wurden junge Fische, welche gerade ausgeschlüpft waren, verwendet. Da sie weniger als ein Zentimeter lang waren, war ihre Masse klein im Vergleich zu dem Volum der Lösung.

Tabelle I.

Durchschnittslebensdauer junger Fundulus in reinen NaCl-Lösungen verschiedener Konzentration.

Beschaffenheit der Lösung		Lebensdauer
100 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl		Weniger als 12 Stdn.
90 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 10 ccm	destill. Wasser	Ungefähr 24 „
80 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 20 „		„ 30 „
50 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 50 „		„ 40 „
20 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 80 „		„ 60 „
10 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 90 „		„ 72 „
0 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 100 „		lebte noch n. 10 Tagen

Dieses Resultat stimmt mit unserer Theorie überein. Aber um den Beweis vollständig zu machen, müssen wir imstande sein, zu zeigen, daß ein Zusatz gewisser anderer Ionen die giftige Wirkung einer reinen NaCl-Lösung aufhebt. Ich versuchte folgende Lösungen bei Fundulus:

(1) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 4 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $MgCl_2$

(2) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 4 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl

(3) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 4 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $CaCl_2$.

In jeder dieser Lösungen starb der Fisch in weniger als 24 Stunden oder ungefähr in dieser Zeit. Nach diesem Experiment wurden zwei Salze in Verbindung mit NaCl versucht, und folgende Lösungen präpariert:

(1) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $MgCl_2$
+ 2 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $CaCl_2$

(2) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $MgCl_2$ + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl

(3) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $CaCl_2$ + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl .

Dieses Mal war der Erfolg schlagend. In der ersten dieser drei Lösungen lebten die Tiere weniger als 30 Stunden, in der zweiten einige Stunden länger, und in der dritten waren sie noch nach 10 Tagen lebendig, als ich das Experiment abbrach. So sehen wir, daß die giftige Wirkung der NaCl-Lösung wirklich verschwindet, wenn wir eine kleine Menge von K und Ca-Ionen zusetzen, was den Beweis unserer Theorie vollsändig macht.

In den reinen NaCl-Lösungen haben wir es mit zwei Ionenarten zu tun, nämlich den Na und Cl-Ionen. Sind beide in gleicher Weise für die giftige Wirkung verantwortlich? Die Tatsache, daß KCl und $CaCl_2$ die giftigen Wirkungen der NaCl-Lösung verhindert, beweist, daß die Metall-Ionen von größerer Wichtigkeit sind, als die Cl-Ionen.

Oben erwähnte ich, daß Fundulus den Zusatz besonders großer Mengen von NaCl zum Seewasser verträgt. Ich versuchte zu bestimmen, ob K und Ca-Ionen imstande wären, auch größeren Dosen von NaCl, wie in einer $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung enthalten sind, entgegenzuwirken. Eine Anzahl junger Funduli wurde in folgende Lösungen gesetzt:

(1) 100 ccm $\frac{1}{8}^0$ n NaCl

(2) 96 ccm $\frac{1}{8}^0$ n NaCl + 4 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl

(3) 96 ccm $\frac{1}{8}^0$ n NaCl + 4 ccm $\frac{1}{8}^0$ n $CaCl_2$

(4) 96 ccm $\frac{1}{8}^0$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{8}^0$ n $CaCl_2$ + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl

(5) 93 ccm $\frac{1}{8}^0$ n NaCl + 5 ccm $\frac{1}{8}^0$ n $CaCl_2$ + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl .

In den Lösungen 1 und 2 starben die Tiere in weniger als zwei Stunden. In der Lösung 3 wurden die Tiere am nächsten Morgen tot gefunden. In der Lösung 4 starben die Tiere innerhalb drei Tagen und in Lösung 5 war noch ein Tier am Ende des dritten Tages lebendig, als das Experiment eingestellt wurde. Die Gegenwart kleiner Mengen von K und Ca-Ionen verhindert oder schwächt die giftigen Wirkungen sogar von großen Quantitäten NaCl.

Ich werde nun einige mögliche Einwendungen gegen unsere Theorie betrachten. Man könnte denken, daß möglicherweise eine kleine Menge HO-Ionen mit dem $CaCl_2$ in Fällen eingeführt sein könnte, in welchen das $CaCl_2$ erwärmt wurde, ehe es gelöst war. Ferner könnte man meinen, daß diese HO-Ionen der wesentliche Bestandteil wäre, welcher das Leben dieser Fische verlängerte, die K-Ionen dagegen würden nur gebraucht, um gewisse Wirkungen der Ca-Ionen zu überwinden. Es besteht in der Tat ein Antagonismus zwischen K und Ca-Ionen, wie Ringers Experimente

zeigen. Aber die Tatsache, daß Fundulus unbestimmbare Zeit in destilliertem Wasser lebt, beweist, daß HO-Ionen nicht notwendig sind, um sein Leben zu erhalten. Der zweite Einwand könnte sein, daß das gebrauchte NaCl Unreinheiten enthielt. Aber dieser Einwand kann sofort widerlegt werden. Das NaCl wurde von verschiedenen bedeutenden Fabriken bezogen und war chemisch rein. Die einzige mögliche Unreinheit könnte eine Spur von K gewesen sein. Aber da ein weiterer Zusatz von K das NaCl unschädlicher machte, so kommt es nicht in Frage, daß die Spur von KCl, welche das NaCl hätte enthalten können, irgend etwas mit den giftigen Wirkungen zu tun hatte. Ein dritter möglicher Einwand könnte sein, daß diese Experimente nur beweisen, daß K und Ca-Ionen für Fundulus notwendig sind. Aber dieser Gedanke wird durch die Tatsache, daß Fundulus unbestimmbare Zeit in destilliertem Wasser leben kann, widerlegt. Vielleicht ist es der Erwähnung wert, daß der positive Beweis für den giftigen Charakter einer reinen NaCl-Lösung nicht möglich gewesen wäre, ohne ein Seetier, wie der Fundulus, für welchen destilliertes Wasser nicht giftig ist. Eine andere Möglichkeit könnte die Gegenwart einer Spur von Säure gewesen sein. Mein Kollege, Prof. Stieglitz war so gütig, das gebrauchte NaCl auf Säure zu prüfen, aber er fand, daß es durchaus frei davon war. Daher sehe ich keine andere mögliche Erklärung der

Resultate, als die Theorie, von welcher wir ausgingen.

Was für reine NaCl-Lösungen zutrifft, gilt natürlich noch mehr für äquimolekulare reine KCl und $CaCl_2$-Lösungen. Sie wirken wie Gifte. Ich habe mich selbst noch nicht überzeugen können, daß ihre giftige Wirkung durch den Zusatz von kleinen Mengen anderer Metall-Ionen verhindert werden könnte.

Die Tatsache, daß Fundulus aus dem Seewasser in destilliertes Wasser gebracht werden kann, ohne irgend eine wesentliche Quellung, oder irgend welche sichtbaren schädlichen Wirkungen, kann ihre Erklärung in dem Einfluß, welchen verschiedene Ionen auf die Absorption von Flüssigkeiten haben, finden. Die oben erwähnten Experimente über die Absorption von Flüssigkeiten durch den Muskel haben gezeigt, daß die einfache osmotische Theorie der Absorption, welche von Botanikern angenommen worden ist, unmöglich richtig sein kann. Doch werde ich dieses Problem an anderer Stelle behandeln.

III. Experimente an Quallen (Gonionemus).

Die Quallen verdanken ihre Fortbewegung den rhythmischen Zusammenziehungen ihrer Schwimmglocke. Ich habe mit einer Art, Gonionemus, die sehr häufig in Woods Hole ist, experimentiert. Wenn wir einen Gonionemus in eine $\frac{3}{8}$ n-Lösung von NaCl bringen, hört diese Qualle bald auf sich rhythmisch zusammenzuziehen.

Zu viele Na-Ionen nehmen die Stelle von Ca- und K-Ionen ein, und dies ändert die physikalischen Eigenschaften der Gewebe in einem solchen Maße, daß keine Zusammenziehungen mehr möglich sind. Wenn eine Qualle wieder in ein normales Seewasser zurückgebracht wird, fängt sie nach kurzer Zeit wieder an sich zusammenzuziehen. In diesem Falle nehmen die Ca- und K-Ionen die Stelle einiger Na-Ionen in den ionisierten Eiweiskörpern ein und dies stellt die Reizbarkeit (oder Kontraktilität) der Meduse wieder her. So sehen wir wiederum, daß die Na-Ionen in einer reinen NaCl-Lösung giftig sind. Wenn diese Idee richtig ist, dürften wir erwarten, daß in einer verdünnteren NaCl-Lösung die Qualle imstande sein würde, sich viel länger zusammenziehen. Das ist in der Tat der Fall. Ich versuchte folgende Lösungen:

90 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 10 ccm destilliertes Wasser
80 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 20 ccm „ „
70 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 30 ccm „ „ usw.

Das Resultat der Experimente war, daß Gonionemus sich am längsten in einer Mischung von gleichen Teilen einer $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung und destilliertem Wasser zusammenzieht. Der Fall ist eine Parallele zu dem von Fundulus mit der Ausnahme, daß Gonionemus kein destilliertes Wasser vertragen kann. Sonst ist das NaCl für Gonionemus desto weniger giftig, je verdünnter es ist. Wir werden zu der Folgerung ge-

zwungen, daß die giftigen Wirkungen der NaCl-Lösung verschwinden müssen, wenn wir ihr gewisse andere Metall-Ionen zusetzen. Wir versuchten die folgenden Lösungen:

(1) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 4 ccm $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$

(2) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 4 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl

(3) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 4 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$.

In den ersten zwei Lösungen machen die Quallen während der ersten Minute einige Zusammenziehungen und hören dann auf. In der dritten Lösung können die rhythmischen Zusammenziehungen eine Stunde dauern. Wenn wir 2 ccm von der $CaCl_2$, KCl, und $MgCl_2$-Lösung nehmen (anstatt 4 ccm) sind die Resultate praktisch dieselben. Danach wurden die folgenden Lösungen versucht:

(1) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl

(2) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$

(3) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$.

In Lösung (1) fanden keine Zusammenziehungen statt, während in den Lösungen zwei und drei regelmäßige Zusammenziehungen eintraten in beinahe normalen Zeitabständen. Sie dauerten eine Stunde oder noch länger. Mg-Ionen wirken in diesem Falle mehr

als K-Ionen. So sehen wir wiederum, daß für die Qualle dasselbe gültig ist, wie für Fundulus. Na-Ionen sind in einer reinen NaCl-Lösung giftig, während dieselbe Lösung durch die Gegenwart einer gewissen Menge von K- und Ca-Ionen unschädlich wird. Unsere Theorie, daß die Reizbarkeit der Gewebe von der Gegenwart von Na-, K- und Ca-Ionen in bestimmten Proportionen abhängt, hat sich wieder einmal bewahrheitet. Es braucht nicht gesagt zu werden, daß eine reine $\frac{5}{8}$ n KCl-Lösung und eine reine $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$-Lösung noch giftiger waren, als eine $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung.

IV. Experimente über Flimmer-Bewegung (Ciliarbewegung).

Die Bedingungen der Ciliarbewegungen wurden an den jungen Larven (Blastula, Gastrula und Pluteus) des Seeigels studiert. Die Bewegungen dieser Larven kommen durch Cilien zustande, die unaufhörlich tätig sind. Ich fand, daß diese Larven in einer $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung nicht schnell sterben. Sie können 24 Stunden darin leben. Aber wenn wir eine kleine Menge $\frac{5}{8}$ n KCl und $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$ zusetzen, so können sie 10 Tage oder länger am Leben und in Bewegung erhalten werden. In der letzteren Lösung kann ihre Entwicklung sich fortsetzen, während in der reinen NaCl-Lösung dies nicht möglich ist.

Ich war jedoch überrascht zu finden, daß diese Flimmerbewegung sich in Lösungen, in denen keine Muskelzusammenziehungen von Fundulus oder Gonionemus möglich waren, fortsetzte. 20 Stunden alte Larven waren im stande ungefähr 48 Stunden in den folgenden Lösungen zu schwimmen.

90 ccm $\frac{1}{8}$ n $MgCl$ + 10 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$

80 ccm $\frac{1}{8}$ n $MgCl$ + 20 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$

50 ccm $\frac{1}{8}$ n $MgCl$ + 50 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$.

Der Leser wird bemerken, daß diese Lösungen kein NaCl enthalten. Ich versuchte die Wirkungen dieser Lösungen auf Gonionemus. Wie zu erwarten war, fand keine Zusammenziehung in diesen Lösungen statt. Folgende Beobachtung ist ebenfalls merkwürdig. Verbindungen von NaCl und KCl wurden versucht:

(1) 80 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 20 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl

(2) 20 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 80 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl .

In beiden Lösungen setzte sich die Flimmerbewegung mehr als 6 Stunden, aber weniger als 18 Stunden fort. Die erste Lösung schien noch ein wenig unschädlicher als die zweite zu sein. Jeder, der Erfahrungen über die Wirkungen von K-Ionen auf Muskelzusammenziehung hat, wird bestätigen, daß es fraglos nicht zu erwarten ist, daß ein Muskel in diesen Lösungen seine Kontraktilität über 6 Stunden behält. Auch Gonionemus war nicht imstande sich darin zu-

sammenzuziehen. Sicherlich warnen uns diese Experimente ohne weiteres als erwiesen anzunehmen, daß die Mechanik der protoplasmatischen Bewegungen überall dieselbe ist, obgleich bis zu einem gewissen Punkte einige Identität bestehen mag. Im Falle der Blastula haben wir es mit sehr jungen embryonalen Gewebe zu tun, und wir werden in einer der folgenden Veröffentlichungen sehen, daß embryonales Gewebe, und besonders die Eizellen sich von Grund aus, was die Wirkungen der Ionen betrifft, von Muskeln und Ganglien unterscheiden.

V. Sind die Na-Ionen unseres Blutes eine indifferente Substanz?

Eine reine NaCl-Lösung (von ungefähr 0,7 %) ist als physiologische Salzlösung bezeichnet worden, insofern, als die Gewebe eines Frosches in solcher Lösung 48 Stunden leben können. Dem NaCl in unserm Blut wird hauptsächlich die Rolle zugeschrieben, die Gewebe zu verhindern, Wasser zu verlieren oder aufzunehmen[1]). Gemäß unserer Ansicht, sind die Na-Ionen des Blutes sowohl wie diejenigen des Seewassers, wesentlich für die Erhaltung der Lebenserscheinungen[2]). Eine Verminderung der Na-Ionen im Blut

[1]) Howell, Americ. Journ. of Physiology, Bd. II (1898) S. 47.

[2]) Vor Kurzem hat Overton einen ähnlichen Gedanken ausgesprochen, ohne sich zu vergegenwärtigen, daß dieselbe Idee von mir bereits in einer Anzahl Schriften ausgedrückt und bewiesen worden war. (1903)

würde zu einem Verlust von Na-Ionen in den Geweben führen und ihre Stelle in den Ionen-Eiweißverbindungen der Gewebe würde von anderen Ionen eingenommen werden. Aber beweist die Tatsache, daß der Muskel eines Frosches ungefähr 48 Stunden in einer $\frac{1}{8}$ n NaCl-Lösung leben kann, ohne vergiftet zu werden, nicht, daß eine reine NaCl-Lösung für den Muskel unschädlich ist? Eine $\frac{1}{8}$ n NaCl-Lösung ist gewiß nicht so giftig, wie eine $\frac{5}{8}$ n-Lösung desselben Salzes. Ein Fundulus, welcher durch eine $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung in 12 Stunden getödtet werden würde, ist imstande, in einer $\frac{1}{8}$ n NaCl-Lösung zwei oder drei Tage zu leben, was ebenso lange oder ein wenig länger ist als die Zeitdauer, welche der Muskel eines Frosches in einer Lösung von derselben Konzentration bei derselben (Sommer) Temperatur erträgt. Daß die Wirkungen einer reinen NaCl-Lösung auf einen Froschmuskel keineswegs von denen auf Fundulus verschieden sind, ist weiter bewiesen durch die Tatsache, daß der Muskel länger in einer NaCl-Lösung, welcher kleine Mengen von KCl und $CaCl_2$ zugesetzt sind, lebt. Dies beweist die Überlegenheit der Ringerschen Lösung über eine physiologische Kochsalzlösung. Erstere verhindert die Na-Ionen der physiologischen Salzlösung die Stelle der Ca- und K-Ionen in den Geweben einzunehmen. Kontraktilität ist nur möglich, wenn die Na-, Ca- und K-Ionen in bestimmten Proportionen in den Ionen-Eiweißverbindungen existieren. Daher

gibt es keinen Grund, anzunehmen, daß das, was wir für Seetiere bewiesen haben, nicht auch für andere Tiere gültig ist.

VI. Zusammenfassung.

Die Hauptresultate dieser Arbeit sind folgende:

1. Eine reine NaCl-Lösung von derselben Konzentration wie das Seewasser ist ein starkes Gift für viele (wenn nicht für alle) Seetiere. Die giftigen Wirkungen dieser Lösung kommen den Na-Ionen zu. Dasselbe gilt für reine äquimolekulare Lösungen von $CaCl_2$ und KCl.

2. Die giftigen Wirkungen der Na-Ionen werden durch den Zusatz von einer kleinen Menge von Ca- und K-Ionen aufgehoben. Durch die Gegenwart dieser zwei Ionenarten verlieren die Na-Ionen im Ozean ihre giftige Wirkung.

3. Die Na-Ionen des Blutes würden den Geweben nicht erlauben, zu leben, wenn nicht die Gegenwart von Ca-, K- und möglicherweise noch anderen Ionen ihren giftigen Wirkungen im Blute entgegen arbeitete. Dies ist der Grund, warum die Gewebe in Ringerscher Lösung länger leben, als in einer physiologischen Kochsalzlösung.

4. Die Ursache, für alle diese besonderen Wirkungen der Na-, Ca- und K-Ionen ist, daß diese (und andere) Ionen mit den Eiweißkörpern und dem Protoplasma Verbindungen eingehen. Die verschiedenen

Metalleiweißverbindungen zeigen verschiedene physikalische Eigenschaften. Muskeln sind nur zusammenziehbar, solange sie alle drei Klassen von Ionen in einem gewissen Verhältnis enthalten, welches jedoch innerhalb gewisser Grenzen variieren kann. In einer reinen NaCl-Lösung werden die Na-Ionen nach und nach die Stelle von den Ca- und K-Ionen in den Ionen-Eiweißverbindungen der Gewebe einnehmen und dies führt zu einem Verlust der Kontraktilität oder Irritabilität. Dies ist der Grund, warum eine reine NaCl-Lösung giftig ist. Aus demselben Grunde sind auch reine äquimolekulare Lösungen anderer Chloride giftig.

5. Die Bedingungen für die Flimmerbewegung der Larven des Seeigels sind in verschiedener Hinsicht von jenen oben erwähnten verschieden. Die Cilienbewegung dieser Organismen kann sich mehrere Tage lang in einer $MgCl_2$ und $CaCl_2$-Lösung, welche frei von Na-Ionen ist, fortsetzen.

IV.

Über die verschiedenen Wirkungen der Ionen auf myogene und neurogene rhythmische Zusammenziehungen und auf embryonales und Muskel-Gewebe[1]).

1. Über die verschiedene Wirkung der Ionen auf den Rand und das Zentrum einer Hydromeduse (Gonionemus).

In einer vorhergehenden Arbeit gab ich eine Anzahl Tatsachen an, welche uns zu der Annahme zwingen, daß nicht die Salze selbst, sondern ihre Ionen in Verbindung mit den Eiweißkörpern stehen, und daß die physikalischen Eigenschaften der verschiedenen Eiweiß-Ionen verschieden sind. Wenn dies wahr ist, muß eine reine Elektrolytenlösung giftig sein. Ich konnte beweisen, daß eine reine NaCl-Lösung von der Konzentration des Seewassers, in welcher Seetiere leben, sie in einer verhältnismäßig kurzen Zeit tötet. Der Zusatz einer kleinen Menge gewisser anderer Metall-Ionen (K und Ca) macht die Lösung unschädlich. Dies unterstützt die Annahme, daß Reizbarkeit von verschiedenen Ionen abhängt, besonders von den

[1]) American Journal of Physiology, Vol. III (1900) S. 383.

Metall-Ionen (Na, Ca, K und Mg), welche in bestimmten Verhältnissen in den Geweben existieren. Aber da jedes Gewebe seine eigene spezifische Reizbarkeit hat, würde daraus folgen, daß verschiedene Gewebe die verschiedenen Ionen in verschiedenen Proportionen besitzen müssen. Dieser Aufsatz enthält das Resultat einer Reihe von Forschungen über diesen Gegenstand.

Gonionemus treibt sich durch rhythmische Zusammenziehungen der Schwimmglocke vorwärts. Diese Schwimmglocke zieht sich jedoch nicht fortwährend zusammen wie das Herz, sondern in Gruppen von rhythmischen Kontraktionen, denen längere Pausen folgen. Die Schwimmglocke der Meduse kann in zwei Regionen eingeteilt werden, eine Randregion, welche den doppelten Nervenring und seine Ganglien enthält und die Mittelregion, welche keine Ganglien hat, aber zerstreute Ganglienzellen besitzen soll. Der Fall ist ähnlich wie beim Herzen, das Ganglien in den Vorhöfen und dem Sinus venosus besitzt, dessen Kammer jedoch frei von Ganglien ist, aber zerstreute Ganglienzellen enthält.

Romanes setzte zuerst auseinander, daß, wenn wir eine Hydromeduse in zwei Stücke schneiden, der Randteil mit den Ganglien fortfährt, sich in ähnlicher Weise rhythmisch zusammenzuziehen wie die ganze Meduse, während das Mittelstück aufhört, sich zu kontrahieren. Diese Resultate sind von mehreren

Autoren bestätigt worden, aber ich habe gefunden, daß die Darlegung von Romanes nur für Seewasser richtig ist. Wenn das Mittelstück einer Hydromeduse in eine reine $\frac{5}{8}$ n NaCl- oder $\frac{5}{8}$ n NaBr-Lösung gelegt wird, beginnt es unmittelbar nach der Operation eine Stunde lang sich rhythmisch zusammenzuziehen. Also ist das Mittelstück, ebenso wie der Rand, spontaner Zusammenziehungen fähig. Aber warum zieht sich das Mittelstück im Seewasser nicht rhythmisch zusammen? Wenn es in eine Lösung von 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $CaCl_2$ gelegt wird, zieht es sich nicht länger rhythmisch zusammen. Dasselbe trifft bei einer Lösung von 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl, oder einer Lösung von 96 NaCl + 2 $CaCl_2$ + 2 KCl zu. Also verhindern die Ca- und K-Ionen des Seewassers das Mittelstück an rhythmischer Zusammenziehung.

Dies harmoniert mit meinen früheren Experimenten über Muskeln des Skelettes[1]). Die letzteren können sich in einer reinen NaCl-, oder einer NaBr-, oder irgend einer Lösung von Na-Ionen rhythmisch zusammenziehen. Aber ein kleiner Zusatz von Ca-Ionen oder K-Ionen oder von Beiden, verhindert solche rhythmische Zusammenziehungen. Wir verdanken es der Gegenwart dieser Ionen in unserm Blut, daß unsere Muskeln sich nicht rhythmisch wie das Herz kontrahieren.

[1]) Studies in general physiology. Zweiter Teil, Seite 518.

So sehen wir, daß es einen typischen Unterschied gibt, zwischen den Wirkungen von Ionen auf rhythmische Kontraktionen, die ihren Ursprung direkt in den Muskeln haben, und solchen, die aus Teilen mit Ganglien, oder solchen, die aus den letzteren selbst entspringen. Daraus, daß der ganze Gonionemus im Rhythmus des Randes schlägt, daß ferner der ganze Gonionemus gerade so immun wie der Rand gegen Ca- und K-Ionen des Seewassers ist, folgt, daß die normalen Zusammenziehungen des Gonionemus in dem Teil, welcher die Ganglien enthält, entspringen. Es ist außerdem wahrscheinlich, daß der Rand und das Mittelstück die drei Metall-Ionen (Na, Ca und K) in verschiedenen Verhältnissen enthalten. Daß dies jedoch nur ein gradueller Unterschied ist, wird durch die Tatsache bewiesen, daß eine Vermehrung der Menge von K- und Ca-Ionen über die des Seewassers hinaus, schließlich die rhythmischen Zusammenziehungen des Randes hemmt. Andererseits ist es wahrscheinlich, daß eine sehr kleine Menge von K- und Ca-Ionen, kleiner als diejenige des Seewassers, dem Mittelstück die rhythmische Kontraktion gestattet.

Dieser Unterschied zwischen dem Rande und dem Mittelstück ist nicht derselbe bei allen Medusen. Wenn wir den Rand einer Acalepha (z. B. Aurelia aurita) abschneiden, beginnt das Mittelstück sich im

Seewasser kurze Zeit nach der Operation zusammenzuziehen. Es ist möglich, daß ein vergleichendes Studium des Herzschlages ähnliche Tatsachen enthüllen würde.

Wir haben also gezeigt, das das Mittelstück eines Gonionemus imstande ist, ungefähr eine Stunde lang in einer reinen NaCl-Lösung rhythmisch zu schlagen, während der ganze Gonionemus oder der Rand in einer reinen NaCl-Lösung, welche außerdem noch eine kleine Menge von K- und Ca-Ionen enthält, sich zusammenzieht. Wie verhält sich ein ganzer Gonionemus in einer reinen NaCl-Lösung? Wie oben dargelegt, vollziehen sich die Zusammenziehungen des Gonionemus im Seewasser in Gruppen, denen lange Pausen folgen. Wenn ein Gonionemus in eine $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung gelegt wird, zieht sich die Schwimmglocke ohne Pause zusammen, und die Geschwindigkeit der Kontraktion vermehrt sich beträchtlich. Innerhalb zwei Minuten kann die Höhe von 200 Kontraktionen in der Minute erreicht werden, bald aber hören die Kontraktionen auf. Wenn die $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung mit destilliertem Wasser verdünnt wird, geht die Vermehrung der Kontraktionszahl langsam vor sich und die Zusammenziehungen dauern länger. Wenn wir eine Lösung von 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{10}$ n $CaCl_2$ gebrauchen, sind die Kontraktionen langsamer, aber sie dauern länger. In einer Lösung von 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl beobachtet man nur im Anfang einige

wenige Zusammenziehungen. In einer Lösung von 96 ccm $\frac{1}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n CaCl zieht er sich sehr langsam, aber viel länger als in einer anderen der erwähnten Lösungen zusammen. In reiner $\frac{1}{8}$ n KCl oder $\frac{1}{80}$ n CaCl-Lösung kommen keine Zusammenziehungen zustande.

Die Erklärung all dieser Tatsachen scheint mir folgende zu sein: Wenn ein Gonionemus in eine reine NaCl-Lösung gebracht wird, beginnen Na-Ionen in die Gewebe einzudringen. Sobald diese eine gewisse Zahl von Na-Ionen enthalten, steigert jede weitere Vermehrung der Na-Ionen den Grad der Zusammenziehungen. Andererseits hat der Ersatz von Ca- und K-Ionen für Na-Ionen die entgegengesetzte Wirkung (solange nicht zu viele Na-Eiweißkörper gebildet werden). Wenn zu viele Na-Ionen in Verbindung mit den Eiweißkörpern getreten sind, hört die Reizbarkeit auf. Wir werden später sehen, daß in diesem Falle der Ersatz der Na-Ionen durch Ca- oder K-Ionen die Reizbarkeit wiederherstellt.

So spielen die Na-Ionen eine wichtige Rolle für die rhythmischen Zusammenziehungen. Es ist ebenso notwendig, daß eine gewisse Zahl von Na-Proteiden in den Geweben des Gonionemus existieren, als daß eine gewisse Zahl von Ca- und K-Proteiden vorhanden sind. Das Verhältnis dieser drei Eiweißkörper ist jedoch augenscheinlich am Rande und im Mittelstück ver-

schieden. In beiden Arten von Geweben ist die relative Zahl der Na-Proteide größer als diejenige der anderen Eiweißkörper.

Diese Ansicht unterscheidet sich von der, die im allgemeinen über Herzschlag angenommen ist, insofern, als NaCl im Blut hauptsächlich dem Zweck dienen soll, die Muskeln zu verhindern, Wasser zu verlieren oder aufzunehmen[1]), während die Ca-Salze als die Ursache der Systole des Herzens angesehen werden und die KCl-Salze die Diastole begünstigen sollen. Die Tatsache, daß eine Meduse sich nicht nur rhythmisch in einer reinen NaCl-Lösung, sondern viel schneller in einer solchen Lösung als im Seewasser zusammenzieht, zeigt, daß weder die Ca- noch die K-Ionen des umgebenden Mediums direkt notwendig für die Systole oder Diastole sind. Wenn sie irgend welche Wirkung haben, so vermindern sie nur den Grad der Zusammenziehung (Außerdem halten sie die Kontraktilität länger aufrecht). Aber die oben erwähnte irrtümliche Vorstellung über die Rolle der drei Ionen kann auch in anderer Weise widerlegt werden. Ich hatte Lösungen von Rohzucker und Glycerin präpariert, welche isosmotisch mit einer $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung waren. Die folgenden Lösungen wurden versucht:

[1]) Howell, American Journal of Physiology. Band II (1898) S. 47.

(1) 96 ccm destilliertes Wasser + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$

(2) 96 ccm Rohrzucker + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$

(3) 96 ccm Glycerin + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$

(4) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n LiCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$

(5) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$

(6) 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaBr + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$

In den ersten vier Lösungen kamen keine rhythmischen Zusammenziehungen nach der ersten Minute zustande. In der 5. und 6. Lösung setzten sich die rhythmischen Zusammenziehungen mehrere Stunden lang fort. Wenn es wahr wäre, daß das NaCl nur dazu dient, den osmotischen Druck aufrecht zu erhalten, während das Ca die Zusammenziehungen erzeugt, dürften wir erwarten, daß der Gonionemus ebenso gut in der Glycerin- oder Zucker- oder LiCl-Lösung wie in der NaCl-Lösung sich zusammenzieht. Ich habe außer diesen noch eine Anzahl anderer Experimente gemacht; alle beweisen, daß nur in Lösungen von Elektrolyten (besonders Na-Salz) Gonionemus fähig ist, sich rhythmisch zusammenzuziehen. Der Glaube, daß Calcium das

Reizmittel ist, welches den Herzschlag erzeugt, ist auf eine andere Beobachtung gegründet, welche, wie ich glaube, zuerst von Howell und seinen Schülern gemacht wurde[1]). Wenn ein Herz in Ringerscher Lösung aufhört zu schlagen, so beginnt es wieder (für eine kleine Weile) in einer Lösung, welche mehr Ca enthält, sich zusammenzuziehen. Es ist leicht, diese Beobachtung bei Gonionemus zu bestätigen. Wenn ein Gonionemus in eine Lösung von 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{10}$ n $CaCl_2$ oder in eine reine $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung geworfen wird, hört er nach einer gewissen Zeit auf sich zusammenzuziehen, aber er bewegt sich wieder ein wenig, wenn er in eine Lösung mit mehr $CaCl_2$ (z. B. 95 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 5 ccm $\frac{1}{10}$ n $CaCl_2$) gebracht wird. Dies scheint die Annahme zu begünstigen, daß die Ca-Ionen das Reizmittel für die Zusammenziehung der Schwimmglocke einer Meduse sind. Aber ein einfacher Kontrollversuch zeigt, daß diese Annahme irrig ist. Wenn wir einen Gonionemus zuerst in die stärkere Lösung (z. B. von 95 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 5 ccm $\frac{5}{8}$ n $CaCl_2$) werfen und warten, bis er aufhört sich zusammenzuziehen, wird er damit wieder anfangen, wenn wir ihn entweder in eine Lösung mit weniger $CaCl_2$ (z. B. 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{10}$ n $CaCl_2$) oder in eine reine NaCl-Lösung bringen. Die wahre Erklärung für diese Erscheinung ist, wie ich glaube, folgende: In der reinen NaCl-Lösung, oder der Lösung mit

[1]) Ibid.

wenig $CaCl_2$ verbinden sich zu viele Na-Ionen mit Eiweißkörpern und dies führt zu einem Verlust der Reizbarkeit. Wenn der Gonionemus in eine Lösung mit mehr Ca- und weniger Na-Ionen gebracht wird, werden einige Ca-Ionen die Stelle von Na-Ionen in den Geweben einnehmen, und dies stellt die Reizbarkeit wieder her. Aber schließlich dringen zu viele Ca-Ionen ein und die physischen Eigenschaften werden wieder verändert und machen so den Gonionemus unreizbar. Wenn derselbe Gonionemus dann in eine reine NaCl-Lösung, oder in eine NaCl-Lösung mit weniger Ca-Ionen gelegt wird, werden die Na-Ionen die Stelle einiger Ca-Ionen einnehmen und dies wird die Reizbarkeit wieder herstellen.

So gelangen wir zu der Schlußfolgerung, daß die rhythmischen Zusammenziehungen von Gonionemus von der Gegenwart der Na-, Ca- und K-Ionen, welche in bestimmten Verhältnissen in den Ionen der Eiweißsubstanzen der Gewebe vorhanden sind, abhängen. Diese Verhältnisse sind augenscheinlich in verschiedenen Arten von Geweben verschieden.

Myogene Zusammenziehungen werden durch eine kleinere Menge von K- und Ca-Ionen in den NaCl-Lösungen verhindert, als es bei neurogenen Zusammenziehungen oder solchen, welche Teilen mit Ganglien entspringen, der Fall ist.

II. Über die verschiedenen Wirkungen von Ionen auf undifferenzierte embryonale Gewebe und auf Muskeln.

Während die in der vorhergehenden Abteilung angegebene Methode erfolgreich auf alle Arten von Geweben angewendet werden kann, war ich sehr begierig zu erfahren, ob es einen bemerkenswerten Unterschied zwischen undifferenziertem, embryonalem und differenzierten älteren Gewebe gibt. Unter embryonalem Protoplasma oder Gewebe verstehe ich die ersten Furchungszellen, die wachsenden Regionen in Pflanzen und Tieren, schnell wachsende Geschwülste, regenerirende Teile und Organe, kurz Zellen, die durch schnelle Vermehrung charakterisiert sind. Wenn wir jemals eine technische oder konstruktive Biologie aufbauen sollten, werden wir es auf der Basis einer gründlicheren Kenntnis des Charakters der embryonalen Materie tun. Ich versuchte herauszufinden, ob die verschiedenen Metall-Ionen dieselbe Wirkung auf die indifferenzierten Eizellen, wie auf den Muskel haben. Diese Experimente werfen einiges Licht auf ein anderes Problem. Die karyokinetische Zellteilung ist mit der Erscheinung von Muskelzusammenziehung identifiziert worden. Wir werden beiläufig sehen inwiefern eine solche Idee gerechtfertigt ist.

In meinen früheren Experimenten über Entwickelung wurde ich von dem Gedanken geleitet, daß den verschiedenen morphologischen Stufen chemische Ver-

änderungen vorangehen. Um zu sehen, in wiefern diese Idee sich rechtfertigen ließe, versuchte ich zu entdecken, ob ein Mangel an Sauerstoff oder eine Vermehrung in der Konzentration des Seewassers den Embryo in den verschiedenen Stufen seiner Entwickelung verschieden angreift[1]). Ich gebrauchte die Eier eines Seefisches (Fundulus) für diese Experimente. Die Eier dieses Fisches vollenden ihre Entwickelung (bei geeigneter Temperatur) in ungefähr zwei Wochen. Wir müssen drei Stufen in der Entwickelung dieses Fisches unterscheiden. Die erste besteht bloß aus Prozessen der Zellteilung und der Ausdehnung des Blastoderms. Diese Stufe dauert ungefähr 24 Stunden. Danach folgt die Bildung und beginnende Differenzierung des Embryo, während der zweiten 24 Stunden. Die dritte Stufe der Entwicklung beginnt mit dem Einsetzen der Muskel-Tätigkeit, besonders des Herzschlages, ungefähr 72 Stunden nach der Befruchtung.

Wenn frisch befruchtete Eier einem partiellen Sauerstoff-Vakuum ausgesetzt werden, kann die Entwickelung einige Zeit weitergehen (ungefähr 24 Stunden). Die Eier können jedoch in dem Sauerstoff-Vakuum 4 Tage lang lebendig bleiben. Wenn sie nach dieser Zeit in normales Seewasser zurückgebracht werden entwickeln sie sich zu einem normalen Fisch. Wenn wir einen drei Tage alten Embryo in dasselbe Sauerstoff-Vakuum bringen, verliert er seine Entwickelungsfähigkeit

[1]) Studies in general physiol. Erster Teil, S. 309.

innerhalb 24 Stunden. Je älter der Embryo ist, desto schädlicher ist der Mangel an Sauerstoff. Dies ist nur begreiflich durch die Annahme, daß die morphologische Differenzierung von Veränderungen in der chemischen Konstitution des Embryo begleitet wird, oder ihr die letzteren vorangehen.

Dieselben Resultate wurden durch Experimente, bei welchen die Konzentration des Seewassers durch den Zusatz von NaCl erhöht wurde, erhalten, aber — seltsam genug — in diesem Falle waren die jüngeren Embryonen gegen den Zusatz von NaCl zum Seewasser empfindlicher als die älteren Embryonen[1]). Ein Zusatz von 5 g NaCl auf 100 ccm Seewasser verhinderte die Entwicklung des Fundulus-Eies nicht, aber ein Zusatz von 10 g NaCl auf 100 ccm, machte die Bildung eines Embryo unmöglich. Frisch befruchtete Eier begannen in einer solchen Lösung sich zu teilen, aber hörten sehr bald auf und verloren nach 6—10 Stunden dauernd ihre Entwicklungsfähigkeit. Ein Keim, der sich im normalen Seewasser während der ersten 24 Stunden entwickeln durfte, widerstand besser einer Lösung von Seewasser, der 10% NaCl zugesetzt worden waren. In einer solchen Lösung konnte die Entwicklung mehrere Tage lang weiter gehen, in einigen Fällen sogar 10—14 Tage lang. Ein Embryo, der sich im nor-

[1]) Zusatz des Verf. (1906). Vermutlich war die membran der älteren Eier weniger durchgängig für Wasser.

malen Seewasser entwickeln durfte, bis seine Zirkulation hergestellt war (am 3. oder 4. Tage), war sogar imstande mehrere Tage im Seewasser zu leben, dem 24% NaCl zugesetzt worden waren. Als ich diese Experimente machte, pflichtete ich noch der gewöhnlichen Ansicht bei, daß NaCl eine indifferente Substanz wäre, und daß es sich in diesen Experimenten nur um osmotische Wirkungen handelte. Die Resultate meiner kürzlich gemachten Arbeit und der Experimente, welche in dieser Schrift erwähnt sind, beweisen jedoch, daß wir in diesen Versuchen mit den Wirkungen von Na- und Cl-Ionen zu rechnen haben. Es folgt daraus, daß die Na- und Cl-Ionen (besonders die ersteren) während den frühesten Stufen der Zellteilung schädlicher sind, als während der späteren. Ich machte neue Experimente über die Einwirkungen verschiedener Ionen auf die Entwicklung der Eier von derselben Art. Wenn die Eier des Fundulus unmittelbar nach der Befruchtung in eine $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung gelegt werden, hört die Entwicklung in den meisten Fällen bei einer frühen Stufe auf (64 bis 128 Zellen), und nur wenige Eier bilden einen Embryo. Wenn die Entwicklung in den ersten 24 Stunden nicht aufhört, hält sie in der Regel in normaler Weise eine oder mehrere Wochen an. Daher scheint eine reine NaCl-Lösung während der ersten 24 Stunden der Entwicklung giftiger zu sein, als in den späteren Stadien. Kontrollversuche bestätigen diese Annahme. Eier, die sich während der

ersten 18—24 Stunden im Seewasser entwickeln durften und dann in eine $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung gelegt wurden, entwickelten sich in fast allen Fällen weiter. Doch kann sich kein Embryo in diesen Lösungen entwickeln.

In unserem früheren Aufsatz zeigten wir, daß ein junger Fisch in einer solchen Lösung nach wenigen Stunden starb. Die Tatsache, daß die Eier länger darin leben, kommt entweder dem Umstande zu, daß die zähe Membran des Eies den Ionen das schnelle Eindringen in den Embryo nicht erlaubt, oder der Gegenwart des Dotters, welcher bis zu einem gewissen Grade das Verhältnis der Ionen in dem Embryo zu regeln vermag. Wenn wir eine $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung mit destilliertem Wasser verdünnen, finden wir, daß in einer $\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung alle frischbefruchteten Eier einen Embryo bilden können. Einige der Embryonen entwickeln sich sogar in einer solchen Lösung. Aber nach dieser Entwicklung ist ihre Lebensdauer sehr kurz. Die Tatsache, daß die Eier des Fundulus sich im Seewasser, dem 5% NaCl zugesetzt waren, entwickeln konnten, zeigt, daß andere Bestandteile des Seewassers imstande sind, die giftigen Wirkungen einer reinen NaCl-Lösung aufzuheben. In einer Lösung von 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl werden nur eine kleine Zahl Embryonen gebildet, die nicht länger als eine Woche am Leben erhalten werden können. In einer Lösung von 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n $CaCl_2$ furcht sich jedes Ei, aber nur in Ausnahmefällen

entwickelt sich ein Fisch. Diejenigen, welche sich entwickeln, sterben bald. Der kleine Zusatz von nur $^1/_2$ ccm $^1/_{80}$ n $CaCl_2$ auf 100 ccm $^5/_8$ n NaCl veranlaßt alle Eier sich zu entwickeln. Eine kleine Menge von Ca-Ionen arbeitet der giftigen Wirkung einer großen Quantität von Na-Ionen genügend entgegen, um den Fortgang der Entwicklung zu erlauben, aber nicht genügend um dieselbe zu vollenden. In einer Lösung von 96 ccm NaCl + 2 ccm $^1/_{80}$ n $CaCl_2$ + 2 ccm $^5/_8$ n KCl entwickeln sich nicht nur die Eier bis zum Fisch, sondern hierin leben sogar die jungen Fische beliebig lange.

In destilliertem Wasser sind alle Eier der Entwicklung fähig, die jungen Fische vollenden dieselbe, schlüpfen zur rechten Zeit aus und leben beliebig lange. Deshalb sind die Ca- und K-Ionen der obenerwähnten Lösung nicht direkt für die Entwicklung des Fisches notwendig, sie sind es nur indirekt, um den giftigen Wirkungen der Na-Ionen in einer Na-Salzlösung entgegen zu arbeiten. In einer Glyzerinlösung von dem osmotischen Druck einer $^5/_8$ n NaCl-Lösung bildete sich kein Embryo. In Mischungen von Glyzerin und Seewasser bildeten sich Embryonen, aber das Glyzerin wirkte als Gift. Je mehr Glyzerin die Lösung enthielt, desto schneller wurden die Embryonen getötet.

So weit stimmen unsere jetzigen Resultate mit unsern früheren über den giftigen Charakter einer reinen NaCl-Lösung überein. Solch eine Lösung hat

eine giftige Wirkung auf den Keim eines Fundulus Die Na-Ionen sind ausschließlich oder hauptsächlich für die giftige Wirkung verantwortlich. Aber diese schädliche Wirkung macht sich während der ersten 24 Stunden der Entwicklung stärker bemerkbar, als in den späteren Stadien.

Jedermann, welcher Erfahrung in den Wirkungen des KCl auf die Zusammenziehung der Muskeln hat, weiß wie schädlich eine reine KCl-Lösung ist. Ich war sehr überrascht zu finden, daß sogar eine $\frac{5}{8}$ n KCl-Lösung weniger schädlich für frisch befruchtete Eier des Fundulus ist, als eine $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung. In der ersteren wurden mehr Eier als in der letzteren entwickelt. Die folgende Tabelle gibt eine deutliche Vorstellung von dem Gesagten. Es wurden Mischungen von $\frac{5}{8}$ n NaCl und $\frac{5}{8}$ n KCl verwendet. Jede Lösung enthielt ungefähr 70 bis 80 Eier. Der Prozentsatz der Eier, welcher Embryonen bildete, ist bei jeder Lösung angegeben.

Tabelle I.

	Charakter der Lösung	Prozentsatz der Eier, welche Embryonen bildeten
1 . . .	98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl	6 %
2 . . .	95 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 5 „ $\frac{5}{8}$ n KCl	10
3 . . .	90 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 10 „ $\frac{5}{8}$ n KCl	25
4 . . .	60 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 40 „ $\frac{5}{8}$ n KCl	30
5 . . .	40 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 60 „ $\frac{5}{8}$ n KCl	40
6 . . .	10 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 90 „ $\frac{5}{8}$ n KCl	33
7 . . .	5 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 95 „ $\frac{5}{8}$ n KCl	33
8 . . .	2 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 98 „ $\frac{5}{8}$ n KCl	33
9 . . .	0 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 100 „ $\frac{5}{8}$ n KCl	38

Es ist augenscheinlich, daß wenn die Zahl der K-Ionen größer als die der Na-Ionen ist, der Prozentsatz der Eier, welche entwickelungsfähig sind, größer wird. Es ist bemerkenswert, daß in einer Lösung von 98 NaCl + 2 KCl weniger Eier Embryonen bilden, als in 95 NaCl + 5 KCl oder in 90 NaCl + 10 KCl, obgleich in diesen letzten 2 Lösungen die Menge des KCl weit größer ist als im Seewasser. Daher müssen wir schließen, daß die K-Ionen für die früheren Stufen des Fundulus weniger giftig sind, als die Na-Ionen. Für die Eier ist es besser, daß K-Ionen als daß Na-Ionen mit den Eiweißkörpern des Protoplasmas in Verbindung treten.

Sobald jedoch das Herz anfängt zu schlagen und die Zirkulation für den Embryo notwendig wird, werden die K-Ionen giftiger als die Na-Ionen. Nur in den ersten drei Lösungen ist das Herz des Embryos im stande, einige Tage zu schlagen. Aber sogar in diesen Lösungen lebt kein Embryo länger als eine Woche. In den anderen Lösungen stirbt der Embryo viel früher. Dies muß uns sicher zur Vorsicht dagegen mahnen, bestimmt anzunehmen, daß die Zell-Teilung eine Erscheinung der Kontraktilität von derselben Art wie die des Muskels ist.

Ca-Ionen sind in kleinen Quantitäten unschädlicher, in großen schädlicher als Na-Ionen. Der Zusatz von ein wenig $\frac{1}{8}^{0}$ n $CaCl_2$ zu einer reinen NaCl oder KCl-Lösung veranlaßt alle Eier sich zu entwickeln,

aber sehr bald ist eine Grenze in dem Zusatz von $CaCl_2$ erreicht, so daß sich keine Embryonen mehr bilden können. Die folgende Tabelle zeigt dies in sehr bemerkenswerter Weise:

Tabelle II.

	Charakter der Lösung	Prozentsatz der Eier, welche Embryonen bildeten
1 . . .	100 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 0 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	15 %
2 . . .	98 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	100
3 . . .	95 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 5 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	100
4 . . .	90 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 10 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	100
5 . . .	75 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 25 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	100
6 . . .	60 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 40 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	9
7 . . .	50 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 50 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	0

In keiner dieser Lösungen war ein Embryo im stande sich zu entwickeln, oder während der ganzen Zeitdauer der Entwickelung zu leben. Die K-Ionen in diesen Lösungen verursachten ein Stillstehen des Herzens. Je mehr K-Ionen die Lösung enthielt, desto eher trat dieser Fall ein. In Mischungen von Na und Ca-Ionen ist die Grenze, von welcher an Ca-Ionen die Bildung eines Embryos verhindern, noch niedriger. In der Regel wird in einer Mischung von 75 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 25 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ kein Embryo gebildet.

Schon lange wird behauptet, daß ein Antagonismus zwischen Ca- und K-Ionen besteht. Das folgende Experiment demonstriert das Verhältnis in einer sehr treffenden Weise: Wenn wir 75 ccm Seewasser

mit 25 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ mischen, ist in der Regel nur ein sehr kleiner Prozentsatz der Eier im stande einen Embryo zu bilden. Aber wenn wir eine große Menge von KCl zusetzen, bildet beinahe jedes Ei einen Embryo. In zwei Experimenten wurde nicht ein einziger Embryo in einer Mischung von 75 ccm Seewasser + 25 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ gebildet, während in 50 ccm Seewasser und 25 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ + 25 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl jedes Ei einen Embryo bildete. Ich habe dieses Experiment sehr oft wiederholt und in jedem Falle gleiche Resultate beobachtet. Aber während die K-Ionen die giftigen Wirkungen der Ca-Ionen auf die Bildung des Embryo aufheben, vermochten die Ca-Ionen den schädlichen Einflüssen der K-Ionen auf den Herzschlag nicht entgegen zu wirken. In keinem der in dieser Lösung gebildeten Embryonen war das Herz im stande lange genug zu schlagen, um den Embryo zu befähigen seine Entwicklung zu vollenden. In der Regel war am 6. Tage jedes Ei todt.

In einer reinen $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ Lösung starb der Keim in den Anfangsstadien der Furchung (4 bis 8 zelliges Stadium). Er sah wie geronnen aus. Nicht einmal in einer Mischung von gleichen Teilen einer solchen Lösung mit destiliertem Wasser wurde ein einziger Embryo gebildet. In einer Lösung von 25 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ in 75 ccm Aqua destillata kamen Embryonen zur Entwicklung. In einem Falle enthielten 30 % der

Eier Embryonen. Dies ist um so bemerkenswerter als in einer Mischung von 75 ccm Seewasser + 25 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$ ein viel kleinerer Prozentsatz der Eier Embryonen bildete. In einer $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ Lösung bildeten alle Eier Embryonen, deren Entwickelung normal verlief.

Wir sollten erwarten, daß, wenn wir Eier unmittelbar nach der Befruchtung in eine reine Lösung eines Na Salzes, dessen Anion Calcium niederschlägt, legen, die verhängnisvollen Wirkungen der Na-Ionen auf die Entwickelung noch auffälliger sein würde, als in einer reinen NaCl-Lösung. Der Niederschlag der Ca-Ionen in dem Protoplasma würde das Mißverhältnis zwischen den Na- und den Ca-Ionen des Protoplasmas erhöhen. Ich versuchte eine $\frac{1}{80}$ n Na_2SO_4 Lösung. In keinem Experiment wurde ein einziger Embryo gebildet, und in jedem Falle hörte die Entwickelung des Keimes auf einer früheren Stufe auf, als in einer reinen NaCl-Lösung. Dies bestätigt unsere Ansicht, das der giftige Charakter einer reinen NaCl-Lösung dem Umstande zukommt, daß für die Entwicklung des Eies die Na-, Ca-, und K-Ionen in bestimmten Verhältnissen im Protoplasma existieren müssen.

In einer reinen $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ Lösung kann sich kein Ei entwickeln. Sogar in gleichen Teilen von $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ und destilliertem Wasser war nur ein kleiner Teil der Eier (20%) im Stande Embryonen zu bilden, von denen sich aber keiner weiter entwickelte. Mg-Ionen

verhalten sich zum Ei des Fundulus sehr ähnlich den Ca- und unähnlich den K-Ionen. In einer Lösung von 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ bilden alle Eier Embryonen, obgleich es nicht zur völligen Entwicklung von Fischen kommt. In größeren Quantitäten sind die Mg-Ionen nicht so giftig wie die Ca-Ionen. Sogar in einer Mischung von gleichen Teilen $\frac{5}{8}$ n NaCl + $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ bilden ungefähr 75 % der Eier Embryonen, (obgleich keine der letzteren sich weiter entwickeln). Dieses Verhalten der Mg-Ionen ist demjenigen ähnlich, welches ich in meiner Abhandlung über die Absorption von Flüssigkeiten beschrieb. Die oben erwähnten Experimente über das Verhalten von K-Ionen zeigen sehr deutlich, daß die Wirkung dieser Ionen auf die Zellteilung ganz und gar verschieden von ihrer Wirkung auf rhythmische Zusammenziehungen ist. Dies ist nicht nur der Fall bei den Zellen des Fundulus, sondern auch bei den Eizellen des Seeigels. Ich beabsichtige in der nächsten Abhandlung die Wirkung der Ionen auf die Zellteilung in den Eiern des Seeigels zu erörtern.

III. Einige allgemeine Schlußfolgerungen.

Die Resultate dieser Abhandlung führen zu mehreren andern Problemen, welche wir bis jetzt keine Gelegenheit hatten genügend zu erörtern. Es besteht die Streitfrage, ob die Zusammenziehungen des Herzens myogen oder neurogen sind. Das Problem ist das-

selbe wie für Gonionemus. Bei dem letzteren ist es gewiß, daß unter gewöhnlichen Umständen (d. h. in Gegenwart von K- und Ca-Ionen des Seewassers) die Impulse für die rhythmischen Zusammenziehungen im Nervensystem oder wenigstens im Randteil entspringen. Es ist jedoch nicht die histologische oder morphologische Struktur der Ganglien, sondern ihre chemische Beschaffenheit, welche ihnen solche Wichtigkeit verleiht. Das Mittelstück des Gonionemus ist im Stande sich in einer reinen NaCl oder NaBr-Lösung zusammenzuziehen. Es ist wahr, daß das Mittelstück des Gonionemus (ebenso wie die Herzspitze) einzelne zerstreute Ganglienzellen enthalten. Man könnte denken, daß diese letzteren für die rhythmischen Zusammenziehungen des Mittelstückes, welche in reinen NaCl oder NaBr-Lösungen stattfinden, verantwortlich sind. Aber die Muskeln des Skelets (sogar wenn sie curarisiert sind) zeigen in denselben reinen NaCl oder NaBr-Lösungen rhythmische Zusammenziehungen, vorausgesetzt, daß die letzteren keine K- oder Ca-Ionen enthalten.

2. Es würde ungerechtfertigt sein, zu sagen, daß Ca oder irgend welche andere Ionen die Ursache, oder das Reizmittel für die rhythmischen Zusammenziehungen des Gonionemus, oder des Herzens oder irgend eines andern Organes seien. Es würde der Wahrheit viel näher kommen, anzunehmen, daß, um rhythmische Zusammenziehungen zu ermöglichen, die Na-, Ca- und K-Ionen in bestimmten Verhältnissen

in dem Gewebe, welches rhythmische Tätigkeit zeigen soll, existieren müssen. Nur so lange wie diese Verhältnisse erhalten werden, besitzt das Gewebe solche physikalischen Eigenschaften und solches labiles Gleichgewicht, um rhythmischer Prozesse oder Zusammenziehungen fähig zu sein. Wenn das Gewebe dauernd, oder eine Zeit lang mehr Ca- und weniger Na-Ionen hat als für die oben erwähnten physikalischen Eigenschaften und Bedingungen des Gleichgewichtes erforderlich sind, so wird eine Vermehrung der Na-Ionen in dem Gewebe rhythmische Zusammenziehung verursachen. In solch einem Falle wird das Gewebe beginnen, sich bei Zusatz einer reinen NaCl-Lösung rhythmisch zusammenzuziehen oder in erhöhtem Maße zu schlagen. Wenn jedoch das Gewebe zu viele Na- und zu wenige Ca-Ionen enthält, wird eine weitere Vermehrung der letzteren in dem Gewebe den Anfang rhythmischer Zusammenziehungen verursachen. In diesem Falle wird der Zusatz von Ca-Ionen zu einer reinen NaCl-Lösung rhythmische Tätigkeit erzeugen. In einer früheren Abhandlung habe ich gezeigt, daß der Skeletmuskel zum rhythmischen Zusammenziehen veranlaßt werden kann, wenn wir die Zahl seiner Na-Ionen vermehren, ohne die Zahl seiner Ca-Ionen zu erhöhen. In einer der folgenden Abhandlungen werde ich beweisen, daß dasselbe Resultat schneller erhalten werden kann, wenn wir die Zahl der Ca-Ionen in dem Muskel durch Niederschlagen von Ca vermindern.

3. Die Erscheinung der Muskel-Kontraktilität und die Erscheinung der Zellteilung werden von vielen Forschern unter denselben Gesichtspunkten betrachtet. Die Strahlen der Astrosphäre sollen zusammenziehbare Fibrillen sein, welche die Chromosomen bei Seite ziehen und die Teilung der Mutterzelle in zwei Tochterzellen vollenden. Ich weiß nicht, wie wir diese Hypothese mit der Tatsache, daß sehr große Mengen von K-Ionen in keiner Weise den Prozeß der Karyokinese stören, in Einklang bringen können, während sogar eine kleine Menge von K-Ionen die Muskeltätigkeit in sehr kurzer Zeit vernichtet. In der vorhergehenden Abhandlung erwähnte ich, daß die Flimmerbewegung der Blastulae des Seeigels sich bei Vorhandensein von selbst sehr großen Mengen von K-Ionen fortsetzt. Das Rätsel der Kontraktilität ist noch ungelöst. Es muß noch bewiesen werden, daß die Flimmerbewegung und die Zellteilung Kontraktilitätsprozessen zukommt, welche mit denen im Muskel identisch sind. Unsere Experimente über die Wirkungen der K-Ionen sollten uns warnen, eine solche Identität als sicher anzunehmen.

4. Während eine Lösung von NaCl mit einer kleinen Menge von K- und Ca-Ionen den verschiedenen Lebensprozessen den Fortgang gestattet (ausgenommen eine solch besondere Erscheinung wie die Bildung des Skelets, was ich in der nächsten Arbeit behandeln werde), finden wir andere Ionen-Verbindungen, die

einige der Lebensprozesse erhöhen, während sie andere verhindern. Die wichtigste Verbindung in dieser Richtung ist die Mischung von $\frac{5}{8}$ n KCl mit einer kleinen Menge von $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$. In einer solchen Lösung finden die ersten Stufen der Entwicklung eines Fundulus-Eies in normaler Weise statt. Die Tatsache, daß eine solche Lösung keine Na-Ionen enthält ruft die Frage hervor, ob bei diesen Erscheinungen nicht die größte Wichtigkeit der Ionen in dem Einfluß liegt, welchen sie auf die physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas haben (Absorption der Flüssigkeiten, Aggregatzustand usw.). Wenn dies der Fall wäre, könnten wir leicht verstehen, daß verschiedene Ionen-Mischungen dieselbe Wirkung auf Gewebe zu Stande bringen könnten, vorausgesetzt, daß sie die physikalischen Eigenschaften des Protoplasmas in derselben Weise beeinflussen. In der nächsten Abhandlung werde ich zeigen, daß die Eier des Seeigels das Blastula-Stadium in einer Mischung von $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ und $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$ erreichen können. Aber jede dieser stellvertretenden Mischungen dient nur für eine gewisse Klasse von Lebensprozessen, während eine Mischung von NaCl mit einer kleinen Menge von Ca- und K-Ionen die Vollendung des ganzen Cyklus der Lebenserscheinung (mit gewissen Ausnahmen) gestattet.

5. Herbst[1]) versuchte zu beweisen, daß jede in dem Seewasser enthaltene Substanz für die Entwick-

[1]) Herbst, Archiv für Entwickelungsmechanik, Band 5 (1897), S. 649.

lung des Seeigeleies notwendig ist. Sein Beweis bestand hauptsächlich darin, daß er einen der Bestandteile des Seewassers entfernte und zeigte, daß in solch modifiziertem Seewasser die Eier sich nicht entwickeln konnten. Diese Methode rechtfertigt nicht die Schlüsse, welche Herbst aus ihr gezogen hat. In einer Lösung von 96 ccm $\frac{1}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{10}$ $CaCl_2$ + 2 ccm $\frac{1}{8}$ n KCl entwickeln sich alle Fundulus Eier zur Vollendung. Wenn wir die Ca-Ionen entfernen, kann sich die Mehrzahl der Fundulus Eier nicht furchen und von den wenigen, die es tuen, kann keines sich weiter entwickeln. Nach Herbst würde daraus folgen, daß das umgebende Medium Ca-Ionen für die Furchung und Entwicklung der Fundulus Eier enthalten muß. Dennoch haben wir gesehen, daß Fundulus Eier sich in destilliertem Wasser furchen und entwickeln. Ca-Ionen sind nur notwendig, wenn die Lösung Na-Ionen in zu großer Menge enthält.

V.

Über die künstliche Erzeugung von normalen Larven aus den unbefruchteten Eiern des Seeigels (Arbacia) [1].

Vor acht Jahren veröffentlichte ich die Resultate einiger Experimente über die Wirkungen einer Vermehrung in der Konzentration des Seewassers auf die Furchung der Eier. Ich hatte gefunden, daß der Zusatz einer kleinen Menge von NaCl zum Seewasser die Furchung des Seeigeleies verzögert. Durch Vermehrung der Konzentration wurde bald ein Punkt erreicht, an welchem keine weitere Segmentierung stattfand. Wenn man mit Sorgfalt die Minimumvermehrung der Konzentration, welche imstande ist, die Furchung des Eies zu verhindern, wählt, und die Eier in dieser Lösung eine oder mehrere Stunden gehalten werden, kommt es zu einer besonderen Erscheinung. Wenn nämlich diese Eier in normales Seewasser zurückgebracht werden, teilen sie sich nicht nacheinander in zwei, vier, acht Zellen und so weiter, sondern fangen sehr bald an, sich zu gleicher Zeit in mehr als zwei Zellen

[1] American Journal of Physiology Band III (April 1, 1900), S. 434.

zu teilen. Je länger das Ei im konzentrierten Seewasser gehalten wird, desto größer ist die Zahl der Zellen, in welche es sogleich zerfällt. Ich sah wiederholt ein ungeteiltes Ei innerhalb 15 Minuten in ein Morulastadium treten, nachdem es in normales Seewasser zurückgebracht worden war. Ich nahm keine gründliche histologische Untersuchung dieser Eier vor. Dr. Conklin war so gütig, eine Anzahl von Eiern, welche im konzentrierten Seewasser gewesen waren und keine Spur von Furchung zeigten, zu färben. „Einige dieser Eier zeigten sehr deutlich 4—30 Kerne, in anderen Eiern war die Furchung des Kernes nicht so vollkommen. Der außerordentlich große Kern schien aus mehreren Teilen, welche jedoch noch miteinander verbunden waren, zu bestehen." Diese histologischen Untersuchungen waren nicht gründlich genug, und es war meine Absicht, sie fortzusetzen. Die Erklärung, welche ich für diese Erscheinung gab, war folgende: Die Furchung des Protoplasmas ist die Wirkung eines Reizes, den der Kern auf das Protoplasma ausübt, und wodurch das Protoplasma sich um den Kern schließt. Wenn wir andererseits ein Ei in Seewasser legen, dessen Konzentration durch den Zusatz gewisser Salze erhöht worden ist, verliert das Protoplasma Wasser und dieser Wasserverlust bewerkstelligt den Verlust der Reizbarkeit. Es gibt eine gewisse Konzentration, bei welcher der Kern noch imstande ist, sich zu teilen,

während das Protoplasma seine Fähigkeit, den von den Kernen ausgehenden Reizen zu entsprechen, verliert. Dies war es, was nach meiner Meinung in dem konzentrierteren Seewasser geschah. Der Kern teilte sich, aber das Protoplasma hatte durch den Wasserverlust seine Reizbarkeit verloren. Deshalb kam es zur Furchung des Kernes ohne Furchung des Protoplasmas. Aber sobald ein solches Ei in normales Seewasser zurückgebracht war, begann das Protoplasma mehr Wasser aufzunehmen und den Reizen des Kernes zu gehorchen (diese Reize schienen mir chemische zu sein). Von jetzt an teilte sich das Protoplasma sogleich in ebensoviele Zellen als vorher Kerne gebildet worden waren [1]).

Im folgenden Jahre erklärte Morgan, daß er meine Experimente wiederholt habe und sie bestätigt fand, aber daß er nicht imstande sei, mit mir in bezug auf die Kernteilung übereinzustimmen [2]). Er fand nur einen Kern in dem Ei und schloß daraus, daß keine Kernteilung im konzentrierten Seewasser stattfindet, aber daß eine sehr schnelle Teilung des Kernes zu stande kommt, wenn die Eier in normales Seewasser zurückgebracht werden. Da er im ganzen nur vier Experimente gemacht hatte, bat ich den verstorbenen Professor Norman, welcher in meinem Laboratorium ar-

[1]) Loeb, Journal of Morphology, Band VII (1892), S. 253.

[2]) T. H. Morgan, Anatomischer Anzeiger, Band IX (1894), S. 141.

beitete, eine größere Anzahl von Experimenten anzustellen, um herauszufinden, ob es eine Teilung des Kernes ohne Furchung des Protoplasmas gäbe, und ob diese Teilung mitotisch wäre. Norman fand, daß durch eine sorgfältige Auswahl in der Konzentration des Seewassers sich eine Teilung des Kernes ohne Furchung des Protoplasmas zu stande bringen läßt, und daß außerdem diese Teilung eine mitotische sei[1]). Die Zahl der Zellen, in welche das Ei sich sogleich nach dem Zurückbringen in normales Seewasser teilt, ist oft größer als die Zahl der in dem konzentrierten Seewasser vorher gebildeten Kerne. Es scheint daher, als ob eine weitere Teilung der Kernmasse unmittelbar nach dem Zurückbringen der Eier in normales Seewasser zustande käme. Der Zusatz von Natriumchlorid schien den Eiern zu schaden, und deshalb bat ich Herrn Norman, die Wirkung anderer Chlorverbindungen zu versuchen. Er fand, daß eine Vermehrung der Konzentration des Seewassers durch einen Zusatz von $MgCl_2$ weniger schädlich ist, als die durch andere Chlorverbindungen. Es scheint mir, daß es bei diesen Experimenten notwendig ist, zwischen zwei verschiedenen, durch den Zusatz von Salzen (oder der Vermehrung der Konzentration des Seewassers) erzeugten Wirkungen zu unterscheiden. Die eine Wirkung ist diejenige, welche auf den Kern hervorgebracht wird und aus einer

[1]) W. W. Norman, Archiv für Entwicklungsmechanik Band III (1896), S. 106.

Zerstörung (Verflüssigung?) der Kernmembran und möglicherweise einer Auflösung der Substanz besteht, welche die Chromosomen zusammenhält. Diese Wirkung scheint sich innerhalb gewisser Grenzen mit der Konzentration des Seewassers zu vermehren. Die andere Wirkung besteht in der allmählichen Hemmung der Beweglichkeit des Protoplasmas. Dies kann möglicherweise einer Verminderung in der Flüssigkeit des Protoplasmas (Wasserstarre) zugeschrieben werden. Diese Wirkung wird auch mit der Vermehrung der Konzentration des Seewassers stärker. An einem gewissen Punkte in der Vermehrung der Konzentration wird die Kernmembran aufgelöst, und die Chromosomen werden (durch Protoplasmabewegungen) zerstreut, zugleich wird das Protoplasma an weiterer Furchung gehindert. Dies wurde von Norman beobachtet. Wenn die Konzentration ein wenig höher ist, so kommt wohl die Auflösung der Kernmembran zustande, aber das Protoplasma kann wegen seiner Starre die Chromosomen nicht zerstreuen und sich nicht teilen. Wenn solche Eier in normales Seewasser zurückgebracht werden, verliert das Protoplasma allmählich seinen Zustand der Starre. Die Bewegungen, welche zur Zerstreuung der Chromosomen führen, kehren eher zürück, als die Teilungsfähigkeit. In solchen Fällen vollzieht sich der Prozeß wahrscheinlich in der Form, in welcher ihn Morgan beobachtete. Es mag Zwischenstufen und Variationen geben.

Ich erwähne diese Experimente hauptsächlich aus dem Grunde, weil sie Morgan zu einem sehr wichtigen Schritt führten, nämlich die Wirkung einer Vermehrung der Konzentration des Seewassers auf unbefruchtete Eier zu versuchen. Er fand, daß Eier, welche in Seewasser gelegt wurden, dessen Konzentration durch den Zusatz von $1^1/_2\%$ NaCl oder $3^1/_2\%$ $MgCl_2$ erhöht worden war, anfingen, sich in zwei oder mehr Zellen zu teilen, wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht wurden. Diese Teilung ging in einigen Fällen bis zum 64 Zellenstadium, aber dann hörte die Entwicklung auf[1]).

Meade machte die Beobachtung, daß die unbefruchteten Eier des Chaetopterus durch den Zusatz einer kleinen Menge von KCl zum Seewasser veranlaßt werden konnten, die Polkörperchen auszustoßen. Der Zusatz von NaCl hatte keine solche Wirkung[2]). Voriges Jahr machte Dr. Mathews ein Experiment mit Labferment, das er nicht veröffentlichte. In einer früheren Arbeit über den Ursprung des Fibrinogen drückte er den Gedanken aus, daß der Ursprung der Astrosphären in einer Zelle einem Gerinnungsprozeß zukommen könne. Die Ansicht war vorher schon von dem Botaniker Alfred Fischer geäußert worden.

---

[1]) T. H. Morgan, Archiv für Entwicklungsmechanik, Bd. VIII (1899), S. 448.

[2]) Meade, Lectures delivered at Woods Hole, 1898 (Boston: Ginn & Co.).

Er versuchte die Wirkung von Labferment auf unbefruchtete Eier des Seeigels, um zu sehen, ob er in dieser Weise das Ei zum Entwickeln bringen könne. Die Eier wurden in eine Lösung von Labtabletten gelegt. Als sie herausgenommen wurden, begannen sie sich zu teilen, aber die Entwicklung ging nicht über die Teilung in eine verhältnismäßig kleine Zahl von Zellen hinaus. Die Erscheinung glich der von Morgan beschriebenen in einem solchen Grade, daß Mathews zu dem Schluß kam, daß es nicht das Labferment war, welches in seinen Experimenten wirkte, sondern die Salze in den Labtabletten. Mit anderen Worten, es lief tatsächlich auf die Vermehrung der Konzentration des Seewassers hinaus, welche die Furchung des unbefruchteten Eies hervorbrachte, gerade wie bei Morgans Experiment.

Es gibt einige frühere Beobachtungen darüber, daß unbefruchtete Eier den Anfang der Furchung zeigen können. Hertwig[1]) erwähnt, daß die Eier der Arthropoden, Echinodermen und Anneliden eine beginnende Furchung zeigen, wenn sie lange Zeit im Seewasser gelassen werden (ungefähr 20 Stunden). Tichomirof soll künstlich in den Eiern des Bombyx den Anfang einer Entwicklung erzeugt haben. Aber diese Eier sind von Natur aus parthenogenetisch. Nußbaum[2])

[1]) O. Hertwig, Die Zelle und die Gewebe, Band I, S. 239.

[2]) M. Nußbaum, Archiv für mikroskopische Anatomie, Band LIII (1899), S. 444.

hat diese Experimente wiederholt, und soweit ich es beurteilen kann, scheinen die unbefruchteten Eier des Bombyx sich unter natürlichen Verhältnissen gerade so gut zu entwickeln, wie unter Tichomirofs Behandlung. Es existiert ein Bericht von Dewitz[1]), daß Behandlung mit Sublimat die Eier eines Frosches veranlaßt, Anfänge der Furchung zu zeigen; aber wenn ich mich nicht irre, machte Dewitz keine Schnitte durch diese Eier und drückte mir gegenüber seine Zweifel aus, ob es eine wirkliche Furchung wäre, oder ob die Oberfläche des Eies einfach nur der von gefurchten Eiern glich.

Kulagin berichtete kürzlich folgendes: „Ich setzte unbefruchtete Eier von Fischen und Amphibien dem Diphtherie-Antitoxin aus und bemerkte bei vielen den Furchungsprozeß“[2]). Da dieser eine Satz alles ist, was er über seine Experimente veröffentlicht hat, so ist es unmöglich, sich eine Meinung über dieselben zu bilden. Wenn eine wirkliche Furchung existierte, bleibt es immer noch eine offene Frage, ob dieselbe nicht durch die Salze des Serums verursacht wurde. Dies sind ungefähr all die Daten, welche zu der Zeit vorhanden waren, als ich meine Experimente in Angriff nahm[3]).

---

[1]) J. Dewitz, Biologisches Zentralblatt, Bd. VII (1887), S. 93.

[2]) Kulagin, Zoologischer Anzeiger, Band 21 (1898) S. 653.

[3]) Ich möchte auch die Beobachtungen von R. Hertwig erwähnen, daß durch Zusatz von Strychnin zum Seewasser die Eier des Seeigels veranlaßt werden können, die erste Furchung zu zeigen.

Inzwischen hatte ich meine Experimente über die Wirkungen der Ionen auf die rhythmischen Muskelzusammenziehungen gemacht und kam zu dem Schluß, daß durch Wechsel der in einem Gewebe enthaltenen Ionen wir diesem Eigenschaften mitteilen können, welche es gewöhnlich nicht besitzt [1]). Ich folgerte, daß es möglich sein könnte, Blastulae oder sogar Plutei aus einem unbefruchteten Ei zu erzeugen, indem man nur die Ionen in dem Ei vertauscht. Solche Veränderungen sind in dreierlei Weise möglich: erstens, indem man die qualitative Beschaffenheit des Seewassers ändert, ohne seinen osmotischen Gesamtdruck zu beeinträchtigen, zweitens, indem man seinen osmotischen Druck durch den Zusatz gewisser Salze ändert, und drittens, indem man beide Methoden vereinigt. Die letzte Art führte zu positiven Resultaten.

Ich begann meine Experimente mit einem Studium über die Wirkungen verschiedener Ionen auf die Entwicklung des befruchteten Eies.

II. Die Wirkungen verschiedener Ionen auf die befruchteten Eier von Arbacia.

Die Eier wurden in normalem Seewasser befruchtet und nach fünf Minuten in die verschiedenen Lösungen gelegt. Die größte Sorgfalt wurde bei Behandlung der Eier angewendet und so wenig Seewasser

[1]) Studies in gen. Phys. Teil II, S. 518.

wie möglich der künstlichen Lösung, welche geprüft werden sollte, zugesetzt. Die Eier wurden in der Weise in Gefäße gesammelt, daß sie eine dicke Schicht bildeten. Ein oder zwei Tropfen aus einer Pipette ergaben all die Eier, welche für ein Experiment nötig waren. Diese zwei Tropfen bestanden hauptsächlich aus Eiern mit einer Minimum-Menge von Seewasser. Das Volumen einer jeder der künstlichen Lösungen war 100 ccm.

Anwendung einer Lösung mit nur einem Chlorid. In einer $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung[1]) fingen 10, 20 und in einem Falle sogar 50 % der Eier an sich zu teilen. Sie erreichten sehr selten das 16zellige Stadium. Die Mehrzahl der Eier hörte bei dem zweizelligen Stadium auf sich zu entwickeln. Die Größe der Zellen war in der Regel von Anfang an ungleich.

In einer Mischung von 90 ccm dieser Lösung mit 10 ccm destilliertem Wasser entwickelten sich ungefähr 80 % der Eier, von denen einige sogar das 32zellige Stadium erreichten. In verdünnteren Lösungen teilten sich weniger Eier, und in Lösungen, welche noch mehr verdünnt waren, als einer Mischung von 70 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 40 ccm destillierten Wassers entspricht, teilten sich in der Regel die Eier nicht. Dies kam nicht von der Verminderung des osmotischen Druckes, denn in einer Lösung von 70 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 30 ccm

[1]) Die Konzentration des Seewassers ist wohl etwas geringer als die einer $\frac{5}{8}$ m NaCl-Lösung (1906).

Rohrzucker von demselben osmotischen Druck fingen einige wenige Eier an sich zu teilen. Sie entwickelten sich nicht über das vierzellige Stadium hinaus. In einer Lösung von gleichen Teilen der NaCl und der Zuckerlösung teilte sich kein Ei.

In einer $\frac{5}{8}$ n KCl-Lösung teilten sich ungefähr 70—80 % der Eier, und viele erreichten das achtzellige Stadium. Eine geringe Verdünnung der KCl-Lösung machte es den Eiern möglich, das 32zellige Stadium zu erreichen. Sogar in einer Mischung von 60 ccm KCl und 40 ccm destilliertem Wasser fingen ungefähr 5 % der Eier an sich zu teilen, aber sie erreichten nur das zwei- oder vierzellige Stadium. In verdünnteren Lösungen fand keine Furchung statt. Die Furchungszellen waren in der Größe gleichförmiger als in den NaCl-Lösungen. Es ist augenscheinlich, daß eine reine KCl-Lösung für die Furchung günstiger ist, als die reinen äquimolekularen NaCl-Lösungen. In einer früheren Arbeit veröffentlichte ich eine ähnliche Beobachtung über das Fundulus-Ei.

In einer $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$-Lösung erreichten die Eier das 32zellige Stadium und in verdünnteren Lösungen, z. B. 50 ccm $MgCl_2$ + 50 ccm destilliertem Wasser, ging die Entwicklung sogar noch weiter (64 Zellen oder noch mehr) [1]. Jedoch variierten die verschiedenen Experimente mit einer reinen $MgCl_2$-Lösung

[1]) Es stellte sich später heraus, daß diese $MgCl_2$-Lösung offenbar nicht die Konzentration hatte, die ich vermutete.

etwas in ihren Resultaten. Im ganzen war das $MgCl_2$ günstiger als das KCl oder NaCl.

In einer $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$-Lösung gab es im günstigsten Falle nur einen Anfang der Furchung. In einer Mischung von 90 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ mit 10 ccm destilliertem Wasser sah ich gelegentlich ein Ei im zweizelligen Stadium. In verdünnteren $CaCl_2$-Lösungen kam keine Spur von Furchung zustande. Daher waren Mg und K für die in diesen Experimenten gebrauchte Konzentration günstiger als Na und Ca-Ionen. Es geht deutlich aus diesen Experimenten hervor, daß das Optimum der Konzentration für jedes dieser vier Chloride verschieden ist.

In einer $\frac{5}{8}$ n LiCl-Lösung blieb die Mehrzahl der Eier ungeteilt und nur sehr wenige erreichten das zweizellige Stadium. Mischungen von LiCl mit Zucker waren nicht vorteilhafter. In reinen Glyzerin- und Zuckerlösungen von demselben osmotischen Druck wie diejenige einer $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung teilte sich kein Ei. Es ist augenscheinlich, daß die Qualität der Ionen in diesen Experimenten wichtiger als der osmotische Druck ist, und daß NaCl keine indifferente Substanz ist.

Lösung mit zwei Chloriden. In einer Lösung mit einem Chlorid konnten die Eier der Arbacia das Blastula-Stadium nicht erreichen. Sind Mischungen von zwei Chloriden günstiger für die Furchung? Unter den möglichen Mischungen von zwei Chloridlösungen desselben osmotischen Druckes wie das Seewasser

fand ich jene zwischen $\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$ und $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ am günstigsten. Die folgenden zwölf Mischungen wurden präpariert[1]):

(1)	100 ccm	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	0 ccm	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(2)	95 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	5 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(3)	90 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	10 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(4)	80 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	20 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(5)	70 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	30 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(6)	60 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	40 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(7)	50 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	50 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(8)	40 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	60 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(9)	30 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	70 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(10)	20 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	80 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(11)	10 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$	+	90 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$
(12)	0 „	$\frac{1}{8}$ n $MgCl^2$	+	100 „	$\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$

In der ersten Lösung erreichten die Eier das 32zellige Stadium. In der 2., 3. und 4. Lösung bildeten sich Blastulae, welche sich jedoch nicht bewegten. Ich dachte zuerst, daß die Gegenwart anderer Ionen für die Beweglichkeit der Cilien erforderlich wäre, aber ich fand, daß Blastulae, welche sich im normalen Seewasser entwickelt hatten, ihre Bewegung in einer Lösung von 80 ccm $\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$ + 20 ccm Seewasser zwei Tage lang fortsetzten. Es ist jedoch möglich, daß in einer solchen Lösung Cilien nicht ge-

[1]) Um eine Wiederholung dieser Zahlen zu vermeiden, erkläre ich hier, daß dieselben zwölf Verhältnisse in all den folgenden Experimenten mit zwei Chloriden gebraucht wurden.

bildet werden können. Ich legte eine Portion dieser Eier, welche das Blastulastadium in einer Mischung von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ erreicht hatten, in normales Seewasser. Am nächsten Morgen bewegten sie sich in der lebendigsten Weise. Es steht sicherlich im Gegensatz zu den herrschenden Anschauungen über Anpassung, daß das Ei der Arbacia in einer Lösung, welche annähernd frei von Na-Ionen ist, die Blastulastufe erreichen kann.

In der fünften Lösung teilten sich nur wenige Eier und erreichten das achtzellige Stadium, während die anderen Lösungen noch ungünstiger waren. Die Furchung war desto regelmäßiger, je mehr die Lösung Mg enthielt, und wurde unregelmäßiger, je mehr Ca-Ionen vorherrschten. Einer der Hauptzüge dieser Unregelmäßigkeit war die ungleiche Größe der Furchungszellen. Da in gewissen Eiern die ungleiche Größe der Furchungszellen ein charakteristischer Zug ist, welcher eine Hauptrolle in der Theorie der Entwicklung spielt, ist es von Interesse, daß solche Unterschiede durch die Gegenwart einer gewissen Menge bestimmter Ionen, besonders von Ca- und Na-Ionen, zustande gebracht werden können.

In den Mischungen von $\frac{5}{8}$ n NaCl mit $\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$ waren die Resultate nicht so gut. Es wurden keine schwimmenden Blastulae gebildet. In Lösungen von 90—30 ccm von $MgCl_2$ mit 10—70 ccm von NaCl wurde das Morulastadium erreicht.

Mischungen von $\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$ mit $\frac{5}{8}$ n KCl waren noch ungünstiger. In Lösungen dagegen, die mehr $MgCl_2$ als KCl enthielten, erreichten die Eier die 32zellige Stufe, ja sie gingen in ihrer Entwicklung sogar noch ein wenig weiter.

Mischungen von $\frac{5}{8}$ n KCl mit $\frac{1}{8}$ $CaCl_2$ gestatteten nur den Anfang der Furchung und dies nur so lange, wie $CaCl_2$ in sehr kleinen Mengen gebraucht wurde. In 96 ccm KCl + 4 ccm $CaCl_2$ ging eins unter 1000 Eiern in das zweizellige Stadium über oder bildete zwei große Zellen mit zwei Mikromeren; in einer Mischung jedoch von 90 ccm KCl + 10 ccm $CaCl_2$ teilte sich kein Ei, und die Lösungen mit mehr Ca waren nicht günstiger.

Eine Verbindung von $\frac{5}{8}$ n NaCl mit $\frac{1}{8}$ $CaCl_2$ war gleichfalls giftig. Sogar in 98 ccm NaCl + 2 ccm $CaCl_2$ gingen die Eier nicht über die Anfangsfurchung hinaus, und in 96 ccm NaCl + 4 ccm $CaCl_2$ starben die Eier im vierzelligen Stadium. Der Erwähnung wert dabei ist, daß die Furchungszellen in diesen Lösungen von sehr ungleicher Größe waren.

Andererseits waren Mischungen von $\frac{5}{8}$ n KCl und $\frac{5}{8}$ n NaCl beinahe ebenso günstig wie die $MgCl_2$-Lösungen. In 98 ccm NaCl + 2 ccm KCl erreichten die Eier das 64zellige Stadium oder gingen sogar darüber hinaus. Dasselbe war in 96 ccm NaCl + 4 ccm KCl der Fall, denn beinahe jedes Ei teilte sich hierin. Weniger günstig waren die Resultate mit mehr KCl und weniger

NaCl. In einer früheren Arbeit wiesen wir darauf hin, daß die verhältnismäßige Unschädlichkeit der K-Ionen für die Erscheinung der Zellteilung im schlagenden Gegensatz zu der Schädlichkeit derselben Ionen für die Erscheinung der Muskelzusammenziehung steht. So sehen wir, daß die folgenden beiden Lösungen von solchen, die zwei Chloride enthalten, die günstigsten für die Entwicklung sind:

(1) 90 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n MgCl + 10 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $CaCl_2$; und

(2) 98 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl.

Lösung mit drei Chloriden. Weder mit einer Lösung von einem Chlorid noch in einer solchen mit zwei Chloriden war es möglich, schwimmende Blastulae zu erhalten. Nach der Erfahrung mit Fundulus[1]) erwartete ich, daß eine Verbindung von drei Metall-Ionen (besonders NaCl mit kleinen Mengen von KCl und $CaCl_2$) den Eiern des Seeigels ermöglichen würde, ihre Entwicklung zu vollenden. Das war in der Tat der Fall. In einer Mischung von 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n $CaCl_2$ + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl erreichten die Eier nicht nur das Blastulastadium und schwammen in der lebendigsten Weise umher, sondern sie gingen in die Gastrula- und sogar in die Pluteusstufe über, allerdings mit der Abweichung, daß kein Skelett gebildet wurde. Solche Larven lebten ungefähr zehn Tage in dieser Lösung!

---

[1]) Studies in gen. Physiol. Teil II, S. 544.

Wir könnten nun denken, daß das NaCl eine indifferente Substanz ist, und daß die Ca- und K-Ionen für die Wirkung verantwortlich sind. Doch aus dem, was in vorhergehenden Abhandlungen gezeigt worden ist, folgt, daß diese Annahme falsch ist, was durch folgende Versuche noch weiter bewiesen wird. Ich hatte Rohrzucker- und Glyzerinlösungen von dem osmotischen Druck einer $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung hergestellt. Tabelle I gibt die Resultate einer Folge von Experimenten.

Tabelle I.

	Charakter der Lösung	Wie weit die Eier sich entwickelten.
1 . . .	96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$	Plutei ohne Skelett
2 . . .	96 „ $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ + 2 $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$	Ungefurcht.
3 . . .	96 „ $\frac{5}{8}$ n LiCl + 2 $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$	Meistens ungefurcht, wenige erreichten die 2zellige Stufe.
4 . . .	96 „ Rohrzucker + 2 $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$	Ungefurcht.
5 . . .	96 „ Glyzerin + 2 $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$	Ungefurcht.

Die Resultate könnten nicht schlagender sein. $MgCl_2$ ist günstiger für das sich teilende Ei als NaCl, aber unter Zusatz von Ca- und K-Ionen teilte sich kein Ei. Diese Experimente beweisen also noch einmal, daß die in den vorhergehenden Abhandlungen entwickelte Meinung richtig ist, nämlich, daß eine reine NaCl-Lösung giftig und eine kleine Menge von Ca- und K-Ionen erforderlich ist, um der giftigen Wirkung einer reinen NaCl-Lösung entgegenzuarbeiten. Es scheint, daß für das Ei des Seeigels die drei Metall-Ionen in

der obenerwähnten Proportion den Kolloiden die physikalischen Eigenschaften geben, um die für den Entwicklungsprozeß erforderlichen Veränderungen der Zellteilung und Assimilation durchzumachen. Ich untersuchte nun, ob es notwendig wäre, daß die Ca- und K-Ionen in gleichen Verhältnissen dem NaCl zugefügt werden. Tabelle II gibt die Resultate dieser Experimente. Es leuchtet ein, daß das Verhältnis von K- und Ca-Ionen innerhalb gewisser Grenzen variieren darf, solange sie in genügender Menge vorhanden sind. Ich will hinzufügen, daß ich bis jetzt noch keine andere Verbindung von drei Chloriden gefunden habe, welche schwimmende Blastulae ergibt. In den früheren Abhandlungen erwähnte ich, daß die Anionen nicht indifferent sind, und daß in einer NaBr-Lösung die rhythmischen Zusammenziehungen eines Muskels eher beginnen, als in einer äquimolekularen NaCl-Lösung. Ich machte nun einige Experimente über die Wirkung von Bromiden auf die Entwicklung. In einer Lösung von 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaBr + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n KCl entwickeln sich die Eier zu normalen Blastulae. In einer Lösung von 96 ccm LiBr + 2 ccm $CaCl_2$ + 2 ccm KCl erreichten die Eier das 16 Zellenstadium, während in der entsprechenden LiCl-Lösung keine Teilung stattfand. Alle diese Experimente zusammen geben uns die Überzeugung, daß verschiedene Ionenverbindungen existieren können, welche dieselbe Wirkung haben.

Tabelle II.

	Natur der gebrauchten Lösungen	Stufe der Entwicklung, welche erreicht wurde.
1 . . .	96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	Normale Blastula
2 . . .	96 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 1 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	Normale Blastula
3 . . .	96 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + $\frac{1}{2}$ „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	Normale Blastula
4 . . .	96 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 1 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	Normale Blastula
5 . . .	96 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + $\frac{1}{2}$ „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	Normale Blastula
6 . . .	96 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + 1 „ $\frac{5}{8}$ n KCl + 1 „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	Normale Blastula ein wenig langsamer entwickelt.
7 . . .	96 „ $\frac{5}{8}$ n NaCl + $\frac{1}{2}$ „ $\frac{5}{8}$ n KCl + $\frac{1}{2}$ „ $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$	Keine Blastula, hörte beim 32zelligen Stadium auf.

Es scheint, als ob die physikalische Beschaffenheit der Kolloide das Wesentliche wäre, und daß diese Beschaffenheit durch verschiedene Ionen-Verbindungen in derselben Weise hervorgebracht werden könnte.

Lösungen, welche die Bildung eines Skeletts ermöglichen. Die nächste Frage war, was für Ionen den oben erwähnten Lösungen zugesetzt werden sollten, um Plutei mit einem Skelett zu erhalten. Ich fand daß eine Spur von Na_2CO_3 diese Wirkung hat.

In einer Lösung von 95 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 cm $\frac{1}{8}^0$ n $CaCl_2$ + 1 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 1 ccm $\frac{1}{5}$ n Na_2CO_3 wurde in drei Tagen ein Skelett gebildet. Dieses Skelett war nicht ganz normal. Es zeigte eine Bildung von Knoten und Kugeln, welche ich niemals in dem in normalem Seewasser gebildeten Skelett sah (Fig. 1 A).

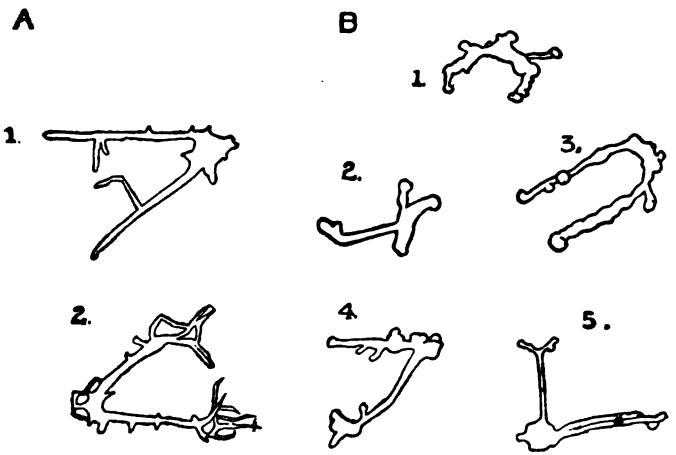


Fig. 1.

Ich war eifrigst bemüht, Plutei mit normalem Skelett zu erhalten und hatte Erfolg, indem ich eine Spur von $MgCl_2$ zu der obenerwähnten Lösung hinzufügte. Die Lösung, welche Plutei mit normalem Skelett ergab, bestand aus 95 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 1 ccm $\frac{1}{8}^0$ n $MgCl_2$ + 1 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{8}^0$ n $CaCl_2$ + 1 ccm $\frac{1}{8}$ n Na_2CO_3. Das Skelett ist in Fig. 1 A skizziert. Es war daher klar, daß der Zusatz einer kleinen Menge

von Na_2CO_3 die Bildung eines Skeletts ermöglichte. Durch Na_2CO_3 kommt ebensowohl eine Vermehrung der HO- als eine solche der CO_3-Ionen zu stande. Welche von den beiden sind für die Bildung eines Skeletts verantwortlich? Der Ersatz des Na_2CO_3 durch KHO ließ die Bildung eines Skeletts nicht zu. Wir müssen daher schließen, daß die CO_3-Ionen das wesentliche sind[1]).

Schlußfolgerungen. So sehen wir, daß eine Mischung von 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl (oder NaBr) + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{10}{8}$ n $CaCl_2$ genügend ist, um das befruchtete Ei der Arbacia sich zu einer Gastrula entwickeln zu lassen. Aber zwingt uns dies zu schließen, daß die drei Kationen Na, K und Ca von dem Ei für den Entwicklungsprozeß benutzt werden? Ich denke, daß unsere früheren Experimente über Fundulus als ein Kriterium für die Beantwortung dieser Frage dienen können. In einer reinen NaCl-Lösung starben die jungen Fische schnell, während sie in der obenerwähnten Mischung lebendig blieben. Und dennoch konnte dieser selbe Fisch in destilliertem Wasser unbegrenzt leben. Dies beweist, daß für ihn keine Ionen aus dem umgebenden Medium notwendig sind. Es könnte sein, daß nur Na-Ionen für die Entwicklung des Seeigeleies nötig sind. In diesem Falle

[1]) Für weitere Tatsachen in betreff der Bildung eines Skeletts bei Seeigeln siehe Herbst, Archiv für Entwicklungsmechanik, Bd. II (1896) S. 455 u. Driesch, ibid. Bd. IX(1899) S. 137.

müßten die K- und Ca-Ionen vorhanden sein, um die giftigen Wirkungen, welche eine reine NaCl-Lösung erzeugen würde, zu verhindern. Andererseits fanden wir, daß sich in einer Mischung von $MgCl_2$ und $CaCl_2$, welche frei von Na-Ionen ist, die Eier entwickeln und beinahe die Blastulastufe erreichen können. Dies macht es noch schwieriger positiv zu erklären, daß die Na-Ionen des umgebenden Mediums für die Entwicklung des Seeigeleis nötig sind. Vielleicht ist es am sichersten anzunehmen, daß eine gewisse physikalische Beschaffenheit — ein gewisses labiles Gleichgewicht — des Protoplasmas der Kolloide für den Prozeß der Zellteilung und Entwicklung aufrecht erhalten werden muß. Dies erfordert gewisse Ionen in bestimmten Verhältnissen, entweder Na, K und Ca (oder andere Verbindungen, z. B. Mg und Ca). Destilliertes Wasser ist Gift für die Eier von Arbacia. Daher werden Ca- und K-Ionen gleichfalls notwendig, wenn Na eine der Ionen in der einschließenden Lösung ist.

Meine Resultate unterscheiden sich etwas von denen, welche Herbst erhielt[1]). Aber ich wies in meiner letzten Arbeit darauf hin, daß Herbst durch seine Methode irregeführt wurde[2]). Seine Methode bestand darin, daß er eine Lösung von derselben Zusammensetzung wie das Seewasser darstellte, in welcher jedoch ein Bestandteil fortgelassen wurde. Falls die

[1]) Herbst, loc. cit. Band V (1897) S. 649.
[2]) Teil II, S. 559.

Eier sich in einer solchen Lösung nicht entwickelten, wurde es als ein Beweis betrachtet, daß der fortgelassene Bestandteil für die Entwicklung der Eier notwendig war. Meine Experimente zeigen, daß diese Schlußfolgerung nicht richtig ist. Es ist ganz gut möglich, daß die Substanz, welche fortgelassen oder entfernt wurde, nicht direkt, sondern nur indirekt für das Ei notwendig war, insofern sie dazu diente, den giftigen Wirkungen eines anderen Bestandteiles der Lösung entgegen zu arbeiten.

Es scheint mir, daß meine Experimente die Einführung eines neuen Begriffes notwendig machen, nämlich denjenigen „physiologisch äquilibrierte Salzlösungen". Hiermit bezeichne ich Salzlösungen, welche solche Ionen in solchen Verhältnissen enthalten, daß die giftigen Wirkungen, welche jeder Bestandteil haben würde, wenn er allein in der Lösung wäre, vollständig aufgehoben wird. Seewasser und Blut (und annähernd eine Mischung von 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{1}{8}^0$ n $CaCl_2$ + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl sind physiologisch äquilibrierte Salzlösungen.

Es wird notwendig sein zu erforschen, inwiefern die Schlüsse der Pharmakologen, Botaniker und Bakteriologen in betreff der Wirkungen verschiedener Salze auf der Basis dieser neuen Tatsachen und Begriffe eine Berichtigung erfordern. Ihre Berücksichtigung könnte sogar bei den Problemen der Immunität und Anpassung nützlich werden.

III. Ist es möglich, Blastulae aus unbefruchteten Eiern zu erzeugen, ohne die Konzentration des Seewassers zu erhöhen?

Die ersten Experimente, mit welchen ich begann, hatten dargelegt, daß eine Vermehrung in der Konzentration des Seewassers die Teilung des Kernes in dem befruchteten Ei verursachte. Morgans Experimente hatten gezeigt, daß derselbe Einfluß das unbefruchtete Ei veranlassen kann, einen Anfang von Furchung zu zeigen. In Meads Experimenten kam es tatsächlich zu keiner Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers, vielmehr schien die Natur der Ionen das Resultat zu bestimmen. Ich wünschte herauszufinden, ob eine Blastula ohne Erhöhung der Konzentration (des osmotischen Gesamtdrucks) des Seewassers aus einem unbefruchteten Ei erzielt werden könnte. Alle meine Experimente haben bis jetzt das Resultat ergeben, daß das unmöglich ist, und daß durch diese Methode nur der Anfang einer Furchung in einem unbefruchteten Ei erzeugt werden kann. Es ist selbstverständlich, daß bei diesen Experimenten bakteriologische Vorsichtsmaßregeln notwendig sind, um sich gegen die Möglichkeit der Einführung von Spermatozoen durch die Instrumente oder gegen ihr etwaiges Vorhandensein im Seewasser zu schützen. Man besitzt ein ziemlich zuverlässiges Merkmal für den Eintritt eines Spermatozoon in das Ei einer Arbacia in der Bildung

der Eimembran. Ein unbefruchtetes Ei hat keine deutliche Membran, aber gleich nach der Befruchtung wird eine sehr deutliche und ziemlich dicke Membran gebildet. Da bei dem folgenden Experiment keins der Eier eine Membran bildete oder mehr als den Anfang einer Furchung zeigte, können wir die Erörterung unserer Schutzmethoden gegen die Befruchtung für den nächsten Abschnitt reservieren. Unbefruchtete Eier desselben Weibchens wurden in drei Portionen geteilt. Eine wurde in eine Lösung von 96 ccm $\frac{5}{8}$ n NaCl + 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$ gelegt. Nach dreiundeinhalb Stunden zeigten einige der Eier einen Furchungsanfang. Nach acht Stunden hatte sich die Mehrzahl der Eier in 2—4 Zellen geteilt. Einige waren sogar noch ein wenig weiter gegangen[1]). Aber dann hörte die Teilung auf. Kein Ei hatte eine Membran. Eine zweite Portion wurde in normales Seewasser gelegt. Acht Stunden später hatte sich keines dieser Eier geteilt oder hatte eine Membran. Dies zeigt an, daß eine Veränderung in der Beschaffenheit des Seewassers allein, ohne Änderung des osmotischen Druckes, den Anfang des Furchung des Eies verursachen kann. Eine dritte Portion wurde in eine Lösung von 96 ccm $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ + 2 ccm $\frac{1}{80}$ n $CaCl_2$

[1]) Ich bin jetzt geneigt zu glauben, daß die normale Konzentration des Seewassers ein wenig niedriger war, als die einer $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösung, und daß dieser Anfang einer parthenogenetischen Entwicklung dem Umstande zukam, daß die gebrauchte Lösung ein wenig hypertonisch war.

+ 2 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl gelegt. Kein Ei teilte sich. Ein Teil dieser Eier wurde nach 5 Stunden in normales Seewasser gebracht. Jetzt gingen einige Eier in das zweizellige Stadium über, aber sie entwickelten sich nicht weiter.

In einer Mischung von 75 ccm $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ mit 25 ccm destilliertem Wasser teilte sich eine Anzahl der unbefruchteten Eier. In gleichen Teilen von $\frac{1}{80}$ n $MgCl_2$ und $\frac{5}{8}$ n NaCl teilten sich keine Eier.

In Meads Experimenten war es KCl, was die Eier des Chaetopterus veranlaßte, ihre Polkörperchen auszustoßen. Ich legte unbefruchtete Eier von Arbacia zuerst 5 Stunden lang in Seewasser. Keines der Eier zeigte eine Spur von beginnender Furchung. Danach wurden dieselben 2 Stunden lang in eine Mischung von 90 ccm Seewasser und 10 ccm $\frac{5}{8}$ n KCl gelegt. Als sie in normales Seewasser zurückgebracht waren, fing beinahe jedes Ei an, sich nach 15 Minuten zu teilen, aber die Teilung ging auch im günstigsten Falle nicht über das 16 Zellen-Stadium hinaus. Weder diese noch die obenerwähnten Experimente gaben konstante Resultate. Die größten Unterschiede existierten in dem Verhältnis der Eier, welche eine Furchung zeigten. In einer früheren Arbeit hatte ich bewiesen, daß der Zusatz einer kleinen Menge von $\frac{1}{10}$ n NaHO eine Vermehrung des Betrages der Entwicklung und des Wachstums des unbefruchteten Arbacia-Eies verursacht, während der gleich geringe Zusatz einer

Säure (HCl) die entgegengesetzte Wirkung erzeugte. Diesen Sommer versuchte ich die Wirkung der HO- und H-Ionen auf das unbefruchtete Ei. Folgende Lösungen wurden hergestellt:

(1) 99 ccm Seewasser + 1 ccm $\frac{1}{10}$ n KHO
(2) 98 „ „ + 2 „ $\frac{1}{10}$ n KHO
(3) 99 „ „ + 1 „ $\frac{1}{10}$ n HCl
(4) 98 „ „ + 2 „ $\frac{1}{10}$ n HCl
(5) 97 „ „ + 3 „ $\frac{1}{10}$ n HCl

In Lösung 1 war nach 5 Stunden beinahe jedes Ei in Furchung, aber dieselbe war sehr unregelmäßig und oft unvollständig, und das Ei zeigte sehr lebhafte amöboide Bewegungen. Nie wurden mehr als zehn Zellen gebildet. In Lösung 2 waren die Wirkungen ähnlich, doch teilten sich weniger Eier. Die Furchung ging nicht weiter. In Lösung 3, 4 und 5 zeigte kein Ei irgendeine Spur von Furchung, ebensowenig teilte sich irgend ein Ei im normalen Seewasser.

Einige der Eier, welche in die Lösungen 4 und 5 gelegt waren, wurden dort nur 10 Minuten gelassen und dann in normales Seewasser zurückgebracht. Fünf Stunden später hatten viele dieser Eier angefangen sich zu teilen. Die Furchung ging nicht über die erste Zellteilung hinaus. Es muß noch gesagt werden, daß das Seewasser naturgemäß einige freie HO-Ionen enthält. Nach einer kurzen Behandlung mit Säure waren die HO-Ionen im Seewasser im-

stande, eine Wirkung auszuüben, welche sie nicht hätten haben können, wenn die Säurebehandlung nicht vorgenommen worden wäre.

Keines dieser Experimente führte jedoch zu der Bildung einer Blastula, auch versprachen sie nicht die geringste Möglichkeit, in künstlicher Weise Blastulae zu erzeugen. Die Experimente wurden zu verschiedenen Zeiten der Laichzeit gemacht. Nach diesen und anderen aussichtslosen Versuchen probierte ich, ob eine Vermehrung der Konzentration des Seewassers bessere Resultate ergeben würde, als eine bloße Veränderung in dem Verhältnis der Ionen. Anstatt der $\frac{5}{8}$ n NaCl und KCl und $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$ und $MgCl_2$-Lösungen versuchte ich jetzt $\frac{1}{8}$ n NaCl und KCl und $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ und $CaCl_2$-Lösungen. Ich will keinen Bericht all der Experimente geben, welche ich in dieser Richtung gemacht habe, sondern ziehe vor, mich auf eines zu beschränken, das mir den richtigen Weg zeigte. Zu diesem Experiment wurden folgende vier Mischungen gebraucht:

(1) 60 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser
(2) 60 „ $\frac{1}{8}$ n KCl + 40 „ „
(3) 60 „ $\frac{1}{8}$ n NaCl + 40 „ „
(4) 60 „ $\frac{2}{8}$ n $CaCl_2$ + 40 „ „

Eine Portion unbefruchteter Eier wurde in diese vier Lösungen verteilt, worin sie eine Stunde und 50 Minuten blieben. Dann wurden sie in normales

Seewasser zurückgebracht. Die Eier, welche in der ersten Lösung ($MgCl_2$) gewesen waren, begannen eine amöboide Formveränderung (durch welche Furchung angedeutet wurde) zu zeigen, nachdem sie wieder ungefähr 15 Minuten lang in normalem Seewasser waren. Ungefähr je eines von 1000 Eiern war in diesem amöboiden Zustande. Solche Veränderungen sieht man nicht in dem normalen Ei, wo die Membran die amöboiden Bewegungen beschränkt. 50 Minuten später teilte sich eins von 1000 Eiern in zwei oder drei Zellen. Die Zellen waren ungefähr von gleicher Größe. Ungefähr $2^1/_2$ Stunden, nachdem die Eier in das normale Seewasser zurückgebracht worden waren, hatte sich ungefähr ein Ei von 500 geteilt, und diese Teilung war zum Acht-Zellen-Stadium vorgeschritten, obgleich nicht alle Eier diese Stufe erreicht hatten. Aber dann hörte die Entwicklung auf. Am nächsten Morgen waren die Eier noch immer ohne Membran. Alle sahen normal und gesund aus. Bei diesem Experiment war das Volumen des normalen Seewassers, in welches die Eier gelegt wurden, nachdem sie in der $MgCl_2$-Lösung gewesen waren, klein (nur ein Uhrglas voll). Daher modifizierten die paar Tropfen der $MgCl_2$-Lösung, welche mit den Eiern übertragen wurden, das Seewasser und beeinträchtigten, wie ich denke, ihre Entwicklung. Ich glaubte, daß unter Vermeidung des genannten Irrtums durch den Gebrauch großer Schalen mit mehreren 100 ccm Seewasser an-

statt des Uhrglases es vielleicht möglich sein könnte, die Eier sich weiter entwickeln zu sehen.

Die Eier, welche in Lösung 2 (60 ccm KCl + 40 ccm Seewasser) gewesen waren, begannen ebenfalls sich zu teilen. Am nächsten Morgen war ungefähr 1 % der Eier in zwei bis vier Zellen geteilt. Sie waren alle ohne Membran, aber sie sahen weniger normal als die $MgCl_2$-Eier aus und fingen bald an sich zu zersetzen.

Die dritte Portion der Eier war in 60 ccm NaCl + 40 ccm Seewasser gewesen. Es teilte sich keines dieser Eier während der nächsten 24 Stunden und keines bildete eine Membran. Die vierte Portion der Eier war in 60 ccm $CaCl_2$ + 40 ccm Seewasser gewesen. Einige derselben zeigten einen Anfang der Furchung, aber jedes Ei hatte eine Membran. Seitdem habe ich gefunden, daß in reinen $CaCl_2$-Lösungen von sogar niedrigerer Konzentration unbefruchtete Eier eine Membran bilden. Es ist möglich, daß die Bildung einer Membran aus einem Gerinnungsprozeß besteht, welcher durch Ca-Ionen begünstigt wird[1]).

Ich machte eine parallele Reihe von Experimenten mit befruchteten Eiern desselben Weibchens. Die Eier waren, wie gewöhnlich, in normalem Seewasser

[1]) Hertwig zeigte, daß unbefruchtete Eier in mit Chloroform gesättigtem Wasser eine Membran bilden. Herbst fand, daß Benzol, Toluol und Xylol dieselbe Wirkung hervorbringen. Alle diese Medien haben eine gerinnende Wirkung. Herbst, Biologisches Zentralblatt, Band XIII (1892) S. 14.

befruchtet worden, und wurden 5 Minuten später in die verschiedenen Lösungen gebracht. Die Eier wurden in vier Portionen geteilt und in Lösungen derselben Zusammensetzung wie bei dem obenerwähnten Experiment mit unbefruchteten Eiern gelegt. Wie diese blieben die befruchteten Eier eine Stunde und 50 Minuten in der Lösung. Als sie in normales Seewasser zurückgebracht waren, fingen die, welche in Lösung 1 (60 ccm $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser) gewesen waren, an, sich innerhalb 15 Minuten zu teilen. Die Teilung war sehr regelmäßig. 2 Stunden und 45 Minuten später war jedes Ei in 8—32 Zellen geteilt. Jedes Ei hatte eine Membran. Am nächsten Morgen schwamm eine große Anzahl von Eiern, noch mit einer Membran bekleidet, im Blastula-Stadium umher. Diese Beobachtung ist wichtig. Sie zeigt, daß sogar bei Eiern, welche in einer Mischung von 60 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ mit 40 ccm Seewasser waren, die Existenz einer Membran dazu dienen kann, zu entscheiden, ob Eier befruchtet waren oder nicht. Die befruchteten Eier, welche in die zweite Lösung (KCl) gelegt wurden, erreichten nicht das Blastula-Stadium. Sie hörten ungefähr bei der 32—64zelligen Stufe mit der Teilung auf. Diejenigen, welche in der dritten Lösung gewesen waren, befanden sich ungefähr in derselben Lage, vielleicht mit der Ausnahme, daß zuerst die Teilung ungleichmäßiger war. In der vierten Lösung ($CaCl_2$) teilte sich kein Ei und nur ein Ei von 1000 zeigte

eine Andeutung der Furchung, die aus einer Einschnürung an einer Seite des Eies bestand.

Endlich wollte ich gern wissen, wie befruchtete und unbefruchtete Eier sich verhalten, wenn sie 18 Stunden lang in einer Mischung von 60 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser gelassen werden. Die unbefruchteten Eier bildeten keine Membran, aber ein sehr großer Teil, mehr als 50% der Eier, teilte sich in zwei bis acht Zellen. Die befruchteten Eier hatten eine Membran. In bezug auf Furchung war wenig Unterschied zwischen den beiden Portionen. Es war besonders dieser Umstand, welcher mir Hoffnung gab, daß es mit ein wenig mehr Sorgfalt möglich sein könnte, lebendige Larven aus unbefruchteten Eiern zu erzeugen, indem man sie mit einer passenden Mischung einer $\frac{2}{x}$ n $MgCl_2$-Lösung und Seewasser behandelt.

In diesen und anderen ähnlichen Experimenten, welche ich nicht beschreiben will, war es überdies augenscheinlich, daß nach der Behandlung mit Mg-Ionen der Charakter der Furchung viel normaler war als nach der Behandlung mit K- und Na- oder Ca-Ionen. Die K-Ionen standen den Mg-Ionen in ihrer Wirkung am nächsten. Die Ca-Ionen waren die ungünstigsten. Die früheren Experimente von Norman hatten ebenfalls das Resultat ergeben, daß die Mg-Ionen die unschädlichsten für die Furchung des Seeigel-Eies waren.

IV. Die künstliche Erzeugung von normalen Larven (Plutei) aus den unbefruchteten Eiern des Seeigels.

Die größte Gefahr bei Experimenten mit unbefruchteten Eiern ist die Möglichkeit, daß das Seewasser oder die Instrumente Spermatozoen enthalten. Es ist daher dringend notwendig, sich gegen beide Möglichkeiten zu schützen. Die Seeigel sind in der unmittelbaren Nachbarschaft des Woods Hole Laboratoriums ausgestorben, und wir müssen deshalb das Dampfboot fortschicken, um sie zu sammeln. Aus diesem Grunde ist sogar während des Höhepunktes der Befruchtungszeit wenig Gefahr vorhanden, daß das Seewasser Spermatozoen in solchen Mengen enthalte, daß die Experimente mit unbefruchteten Eiern beeinträchtigt werden könnte. Außerdem ist die Gefahr, daß die in dem Seewasser des Laboratoriums enthaltenen Spermatozoen die Experimente mit unbefruchteten Eiern schädigen könnten, selbst während der Höhe der natürlichen Entwickelungszeit nicht sehr groß. Dies wird indirekt durch die Tatsache gezeigt, daß bei den im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Experimenten nicht ein einziges Ei durch die Verunreinigung des Seewassers mit Spermatozoen befruchtet wurde. Die Spermatozoen verlieren bald das Vermögen, in das Ei einzudringen, wenn sie im Seewasser zerstreut sind.

Gemmill fand experimentell, daß dies in weniger als fünf Stunden stattfindet, nachdem die Spermato-

zoen die Hoden verlassen haben[1]). Meine Experimente wurden fortgeführt, nachdem die natürliche Entwicklungszeit vorüber war, im September, als die Mehrzahl der freilebenden Seeigel keine Eier mehr enthielt. Ich hatte mich schon mit dem Gedanken vertraut gemacht, daß meine weiteren Experimente ein Jahr verschoben werden müßten, als ich durch die Güte von Professor Bumpus, Mitglied der Fischkommission, einige Dutzend Seeigel erhielt, welche er in einer früheren Jahreszeit gesammelt und seitdem in einem kleinen Teich gehalten hatte. Zufällig war beinahe jedes dieser Tiere ein Weibchen und mit Eiern gefüllt. Obgleich nur eine geringe Möglichkeit vorhanden war, daß das fließende Wasser des Seelaboratoriums einige Spermatozoen des Seeigels, welche imstande waren, die Eier zu befruchten, enthalten könnte, hatte ich doch kein Recht, irgend etwas in dieser Richtung als gewiß vorauszusetzen. Deshalb leitete ich mit jedem Experiment eine Reihe von Kontrollversuchen ein, um gegen die Möglichkeit der Verunreinigung des Seewassers mit Spermatozoen geschützt zu sein. In der Regel wurde folgende Versuchsanordnung getroffen: Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden in drei oder vier Portionen geteilt. Eine Portion wurde in die künstliche

[1]) Gemmill, Journal of Anatomy and Physiology, Bd. 24 (1900), S. 163. Die Resultate sind viel besser, wenn steriliziertes Seewasser gebraucht wird, wie es bei Fischers Experimenten der Fall war (1903).

Lösung gelegt, durch welche ich die Entwicklung der unbefruchteten Eier zu verursachen hoffte. Die zweite Portion wurde in normales Seewasser gelegt, um als Probe oder Kontrolle für die Gegenwart von Spermatozoen im Seewasser zu dienen. Die dritte Portion wurde in eine künstliche Lösung gelegt, welche in der Regel weniger von dem normalen Seewasser abwich, als die Lösung, welche die Entwicklung des Eies verursachte. Jedesmal wenn die Eier einer Portion in das normale Seewasser zurückgebracht waren, wurden auch die Eier der anderen Portionen in dasselbe Seewasser gelegt.

So wurden alle drei Portionen Eier in Seewasser, das genau dieselbe Möglichkeit der Verunreinigung mit Spermatozoen darbot, gehalten. In keinem Falle bildete ein einziges Ei der drei Portionen eine Membran. Kein Ei von Portion zwei, welche die ganze Zeit über in normalem Seewasser geblieben war und als eine Probe für die Gegenwart von Spermatozoen diente, zeigte irgendwelche Entwicklung, ausgenommen nach ungefähr 20 Stunden eine beginnende Furchung (2—3 Zellen). In keinem Falle entwickelte sich irgend eins der Eier von Portion zwei und drei zu einer Blastula.

Die Hauptquellen der Infektion mit Spermatozoen bei solchen Experimenten sind die Instrumente und die Hände des Experimentators, wenn er männliche und weibliche Tiere zu gleicher Zeit öffnet. Bei

meinen Experimenten wurden die Schüsseln mit frischem (süßem) Wasser gereinigt, meistens am Abend vorher, ehe das Experiment gemacht wurde. Die dabei gebrauchten Instrumente waren mit Süßwasser gereinigt und 24 Stunden trocken gehalten worden. Im Falle, daß das erste Tier, welches geöffnet wurde, ein Männchen war, wurden die Instrumente beiseite gelegt, die Hände desinfiziert und neue Instrumente für das nächste Tier gebraucht. Zufällig war in beinahe jedem der folgenden Experimente das erste Tier, das geöffnet wurde, ein Weibchen, und so wurde die Hauptgefahr der Verunreinigung mit Spermatozoen natürlicher Weise vermieden.

Aber, wenn diese Experimente auch nicht mit solcher Vorsicht ausgeführt worden wären, so waren doch die erhaltenen Resultate derart, daß sie durch sich selbst jeden Gedanken der Verunreinigung durch Spermatozoen ausschlossen. In all den erfolgreichen Experimenten waren die Kulturen der unbefruchteten Eier, welche mit der richtigen $MgCl_2$-Lösung behandelt worden waren, am nächsten Tage voll von Blastulae. 20%, in einigen Fällen sogar mehr, beinahe 50% der Eier, hatten sich entwickelt. In früheren Experimenten mit unbefruchteten Eiern, in welchen solche Vorsichtsmaßregeln nicht gebraucht wurden, bemerkte ich niemals, daß mehr als vielleicht ein Ei von 1000 sich entwickelte. Ich werde jede Reihe von Experimenten für sich beschreiben. Das $MgCl_2$,

das in diesen Versuchen verwendet wurde, war chemisch rein, außerdem durch Erwärmen getrocknet.

Erste Reihe. Unbefruchtete Eier desselben Weibchens werden in vier Portionen geteilt und in die folgenden vier Lösungen verteilt:

(1) 60 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser,

(2) 100 ccm $\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$,

(3) 100 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$,

(4) 100 ccm normales Seewasser.

Nachdem die Eier $1^1/_2$ Stunden in diesen Lösungen gewesen waren, wurden sie sorgfältig untersucht. Keins hatte eine Membran und keins war geteilt. 20 Minuten später wurde ein Teil der Eier aus jeder dieser vier Lösungen in normales Seewasser zurückgebracht. Das letztere war für alle vier Lösungen dasselbe. Diesmal sah ich mit besonderer Sorgalt darauf, daß jede Portion der Eier genügend normales Seewasser erhielt (ungefähr 200 ccm). Nachdem sie ungefähr 2 Stunden und 50 Minuten in normalem Seewasser gewesen waren, wurden sie wieder untersucht. Die Eier, welche in Lösung 1 gewesen waren (60 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser), waren alle ohne Membran. Ungefähr 20% der Eier waren in etwa 32 Zellen geteilt. Die Eier, welche in Lösung 2 (100 ccm $\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$) gewesen waren, blieben ohne Membran und ungeteilt. Viele von denen, welche in Lösung 3 (100 ccm $\frac{1}{8}$ n $CaCl_2$) gewesen waren, hatten eine Membran. Nur wenige waren sehr unregelmäßig in

zwei oder drei Zellen geteilt. Alle Eier wurden wieder nach drei Stunden untersucht. Jene, welche in Lösung 1 gewesen waren, befanden sich jetzt im Morulastadium. Da sie keine Membran hatten, war ihr Umriß sehr unregelmäßig, und ich war neugierig auf die Art Blastula, welche aus diesen Eiern hervorgehen würde, wenn sie jemals diese Stufe erreichen sollten. Die Eier, welche in Lösung 2 (100 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $MgCl_2$) gewesen waren, blieben ohne Membran und ungeteilt. Von den Eiern, welche in Lösung 3 (100 ccm $\frac{1}{8}^{0}$ n $CaCl_2$) gewesen waren, hatten sich ungefähr 5% in 2—4 Zellen von sehr ungleicher Größe geteilt. Die letzte Untersuchung hatte am Abend stattgefunden. Am nächsten Morgen waren die Eier der Lösung 1 voll von Blastulae, einige mit regelmäßigen, die Mehrzahl jedoch mit phantastischen Umrissen (siehe Fig. 3). Ihre Größe war sehr ungleich. Ich hatte dies nach der unregelmäßigen Erscheinung der Morulae am Abend vorher erwartet. In dem befruchteten Ei verhindert die Membran jede Unregelmäßigkeit in der Form der Blastulae, während die unbefruchteten Eier keine Membran haben. Daher werden die Zellen nur durch eine intrazelluläre Substanz oder durch Adhäsion zusammengehalten. Aber es ist sehr wahrscheinlich, daß der Prozeß der Zellteilung von amöboiden Bewegungen (Fig. 2), welche die Wirkung haben, die Anordnung der Zellen unregelmäßig zu machen, begleitet wird. Ich habe diese Wirkung der amöboiden Bewe-

gungen der Furchungszellen in meinen Experimenten über Eier, die ich zum Platzen gebracht hatte, und deren Inhalt teilweise aus dem Ei herausfloß, bemerkt und beschrieben [1]).

Diese Extraovate waren in ihrem Verhalten den unbefruchteten Eiern ähnlich. Im letzteren Falle war es aus der Größe der Blastulae offenbar, daß nur in seltenen Fällen sich das ganze Ei zu einer einzigen Blastula entwickelt hatte. In der Regel gab jedes Ei der Bildung mehrerer Blastulae den Ursprung. Durch die mit dem Prozeß der Zellteilung verbundenen amöboiden Bewegungen wurden Gruppen von Zellen getrennt und entwickelten sich zu Zwerg-Blastulae. Ich werde diesen Punkt noch genauer in Verbindung mit den Zeichnungen erörtern.

Ich habe ein Kontrollexperiment, welches ich in dieser Folge machte, noch nicht erwähnt. Ich hatte einen Teil der Eier desselben Weibchens befruchtet und ebensolange Zeit wie die unbefruchteten Eier in dieselben vier Lösungen gelegt. Jedes der befruchteten Eier bildete eine Membran. Das Verhalten dieser Eier und ihrer Larven unterschied sich auch in anderer Hinsicht von den aus den unbefruchteten Eiern erzeugten Larven. Während die Blastulae der befruchteten Eier sogar nach der Behandlung mit Lösung 1 auf der Oberfläche des Seewassers

[1]) Loeb, Archiv für Entwicklungsmechanik. Band 1 (1895), S. 453.

schwammen, waren die parthenogenetischen Blastulae alle auf dem Boden der Schüsse und unfähig, sich zu erheben. Dieser Unterschied scheint typisch zu sein, da ich ihn bei all meinen Experimenten fand. Alle die parthenogenetischen Blastulae in diesen Experimenten starben während des Tages. Es ist selbstverständlich, daß die Blastulae, welch sich aus den befruchteten Eiern entwickelten und m Lösung 1 behandelt wurden, nicht die unregelmäßig Beschaffenheit der parthenogenetischen Larven, welch sich ohne Membran entwickelt hatten, zeigten.

Unbefruchtete Eier, welche in Lösung 2 1 Stund und 50 Minuten gewesen waren, zeigten sich a nächsten Tag ungeteilt und ohne Membran. Die un befruchteten in Lösung 3 gewesenen Eier waren all tot. Die unbefruchteten Eier, welche die ganze Ze in normalem Seewasser gehalten wurden, waren ohn Membran und ungeteilt. So ist es augenscheinlich daß die unbefruchteten Eier von Arbacia, wenn s 1 Stunde und 50 Minuten in eine Lösung von 60 cc $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser gelegt werden, im stande sind, sich zu beweglichen Blastulis zu en wickeln. Aber es wird durch die Kontrollexperimen ebenso augenscheinlich, daß dies nicht allein de Partialdruck oder der Konzentration der Mg-Ione zugeschrieben werden kann, denn in Lösung 2 (100 cc $\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$) war die Konzentration der Mg-Ionen be nahe dieselbe wie in Lösung 1, und dennoch wur

kein unbefruchtetes Ei durch diese Lösung zur Furchung veranlaßt. Daß die letztere Lösung nicht sehr giftig für das Arbacia-Ei ist, wird durch die Tatsache, daß die befruchteten Eier der Arbacia sich in dieser Lösung besser entwickeln, als in 60 ccm $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser hinreichend gezeigt. Es ist also klar, daß die Mg-Ionen allein nicht imstande waren, die Entwicklung der unbefruchteten Arbacia-Eier, welche in Lösung 1 gewesen waren, herbeizuführen. Entweder ist die Gegenwart anderer Ionen, wie solche, in 40 ccm Seewasser enthalten sind, oder der vermehrte osmotische Druck in der Mischung von 60 ccm $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser wesentlich für die Entwicklung. Der osmotische Druck einer $\frac{10}{8}$ n $MgCl_2$-Lösung ist nicht sehr verschieden von dem des Seewassers.

Zweite Reihe. — Es war natürlich meine nächste Aufgabe, dieses Experiment zu wiederholen. Ich kannte nun die Lösung, welche gebraucht werden mußte, um parthenogenetische Blastulae zu erlangen, aber ich wollte herausfinden, wie lange die Eier in dieser Lösung bleiben mußten, um sich zu einer Blastula zu entwickeln. Ich legte um 10 Uhr eine Quantität unbefruchteter Eier eines Weibchens in eine Lösung von 60 ccm $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser. In verschiedenen Zwischenräumen wurde eine Portion dieser Eier aus der Lösung genommen und in 200 ccm normales Seewasser zurückgebracht. Mit der ersten Portion

geschah dies nach 30 Minuten. Nicht ein Ei hatte eine Membran oder zeigte Teilung. Die zweite Portion wurde nach 65 Minuten in normales Seewasser zurückgebracht, die dritte nach 1 Stunde und 40 Minuten, die vierte nach 1 Stunde und 50 Minuten, die fünfte nach 2 Stunden und 5 Minuten, die sechste nach 2 Stunden und 15 Minuten, die siebente nach 2 Stunden und 30 Minuten und die achte nach 3 Stunden und 15 Minuten. Die Portionen 1, 2 und 8 unterschieden sich in bezug auf die Zeit, welche sie der künstlichen Lösung ausgesetzt waren, sehr von den Portionen 3, 4, 5, 6 und 7, welche aus der Lösung in viel kürzeren Zwischenräumen genommen wurden. Kein Ei in irgendeiner dieser Lösungen hatte eine Membran oder zeigte eine Spur von Furchung zu der Zeit, als es in normales Seewasser zurückgebracht wurde. Um 1 Uhr 15 wurden alle Eier wieder untersucht. In den Portionen 3 bis 7 waren viele Eier in 2 bis 16 Zellen geteilt. 16 Zellen-Stadien wurden nur in Portion 4 gefunden. Die übrigen waren nicht über das 8zellige Stadium hinausgekommen. In Portion 2 hatten sich sehr wenige Eier geteilt, in Portion 1 waren alle Eier geteilt. Kein Ei hatte eine Membran. Eine andere Untersuchung der Eier wurde 3 Uhr 5 gemacht. In Portion 1 waren ungefähr 1 % der Eier in 2 Zellen geteilt, in Portion 2 ungefähr 5 %, von denen die meisten in 2, einige jedoch in 8 oder sogar in 16 Zellen geteilt waren. In Portion 3 teilten sich ungefähr 20 %. Einige hatten

das 32Zellen-Stadium erreicht. In Portion 4 waren mehr als 20% geteilt, einige sogar in 32 Zellen. In Portion 5 war beinahe jedes zweite Ei geteilt. Einige hatten sogar die 32zellige Stufe erreicht. Dasselbe war der Fall bei den Portionen 6 und 7. In Portion 8 hatten sich viele Eier geteilt, aber sie waren in ihrer Entwicklung weit zurückgeblieben. Kein Ei hatte eine Membran. Die einzelnen Zellen klebten nicht so dicht zusammen, wie sie es bei dem befruchteten Ei mit der Membran zu tun pflegen. Das Aussehen der Eier ließ mich fürchten, daß sie keine Blastulae erzeugen würden, da es schien, als ob die Furchungszellen alle auseinander fallen würden.

Die Eier wurden nicht vor dem nächsten Morgen untersucht. In den Portionen 1 und 8 waren keine sich bewegenden Blastulae vorhanden, wenigstens konnte ich keine beobachten. In Portion 7 fand ich eine kleine Anzahl Blastulae. In Portion 3, 4, 5 und 6 war das Wasser auf dem Boden der Schüssel voll von Blastulae, welche durch ihre unregelmäßigen Umrisse und die Verschiedenheit ihrer Größe deutlich verrieten, daß sie sich aus Eiern ohne Membran entwickelt hatten.

Am Nachmittag fand ich lebende Larven nur in den Portionen 3, 4, 5 und 6. Einige Larven schienen in einem Gastrula-Stadium zu sein und andere sogar in dem Übergangsstadium zu der Pluteusform. Viele waren gestorben, und dies erklärte vielleicht die Tat-

sache, daß keine Blastulae in den Portionen 2 und 7 geblieben waren, wo sie im günstigsten Falle sehr spärlich hätten sein können. Am nächsten Morgen waren nur noch wenige Larven in den Portionen 3 bis 6 übrig geblieben, und diese starben während des Tages.

Ich erklärte am Anfang meiner Experimente, daß nur ein Teil der Eier eines Weibchens in die $MgCl_2$-Lösung gelegt war. Die andern wurden in normalem Seewasser gelassen, um als Kontrollmaterial zu dienen. Keins der Eier, welche in demselben Seewasser waren, wie das, welches für die mit der $MgCl_2$-Lösung behandelten Eier gebraucht wurde, bildete eine Membran. Nach 24 Stunden wurden einige in 2 Zellen geteilte Eier gefunden. Kein Ei entwickelte sich über diese Stufe hinaus.

Dieses Experiment zeigt, daß die Zeit, während welcher unbefruchtete Eier in Berührung mit einer Mischung von 60 ccm $\frac{2,0}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser bleiben müssen, um Blastulae zu erzeugen, nach zwei Richtungen begrenzt ist. Wenn die Eier nur 30 Minuten in einer solchen Lösung bleiben, können einige von ihnen anfangen, sich zu entwickeln, aber keins wird die Blastulaestufe erreichen. Aber wenn die unbefruchteten Eier $1\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden in dieser Lösung bleiben, können sich mehr als 20 % und sogar bis 50 % entwickeln, und dann ist die Lösung voll von sich bewegenden Blastulae, welche jedoch auf dem

Boden der Schüssel bleiben. Andererseits wird die Zeitgrenze überschritten, wenn die Eier in der Lösung länger als $2^1/_2$ bis 3 Stunden gelassen werden.

Ich versuchte in dieser Folge ein anderes Experiment, um zu sehen, wie bald die unbefruchteten Eier ihre Fähigkeit, von der $MgCl_2$-Lösung beeinflußt zu werden, verlieren würden. Die Eier wurden 80 Minuten lang in normalem Seewasser gelassen, dann zwei Stunden lang in eine Lösung von 60 ccm $^2/_8$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser gelegt. Nach 2 Stunden wurden sie in normales Seewasser zurückgebracht. Eine große Anzahl der Eier fing an, sich zu teilen, aber ich fand am nächsten Tag keine Blastulae.

Dritte Reihe. — So hatte ich die richtige Lösung, um aus unbefruchteten Eiern Blastulae zu erzeugen, gefunden, ebenso, wie lange die Eier in dieser Lösung bleiben müssen. Ich wünschte nun diese Resultate zu bestätigen und außerdem genau herauszufinden, wieweit die Verhältnisse zwischen dem Seewasser und der $^2/_8$ n $MgCl_2$-Lösung variieren könnten, ohne die Resultate zu beeinträchtigen. Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden in die folgenden Lösungen verteilt:

(1) 60 ccm $^2/_8$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser
(2) 30 ccm $^2/_8$ n $MgCl_2$ + 70 ccm Seewasser
(3) normales Seewasser.

Zu verschiedenen Perioden (1 Stunde, 1 Stunde und 40 Minuten, 1 Stunde und 55 Minuten, 2 Stunden

und 20 Minuten, 2 Stunden und 45 Minuten) wurden Portionen der Eier aus den Lösungen 1 und 2 in normales Seewasser zurückgebracht. Nach allem was gesagt worden ist, scheint es überflüssig zu sein, alle Einzelheiten so ausführlich zu geben, wie bei den vorhergehenden Experimenten, und ich werde mich deshalb auf eine Beschreibung der Hauptresultate, wie sie am nächsten Morgen erschienen, beschränken. Die Eier in Lösung 3 (normales Seewasser) hatten keine Membran, auch hatte sich kein Ei geteilt. Es ist offenbar, daß unbefruchtete Eier nicht immer in normalem Seewasser nach 20 bis 24 Stunden die Furchung beginnen. Von den Eiern, welche 1 Stunde und 55 Minuten in Lösung 1 gewesen waren, hatten sich ungefähr 25 % zu einer Blastula, welche umherschwamm, entwickelt. Ungefähr dasselbe Resultat wurde von der Portion, welche 2 Stunden und 20 Minuten in Lösung 1 gewesen war, erhalten. Das Aussehen dieser Blastulae war dasselbe wie bei den vorhergehenden Experimenten. Die meisten derselben waren nur Bruchstücke eines Eies, und es war nicht ungewöhnlich, 4 kleine Blastulae zusammen schwimmen zu sehen. Jede hatte sich augenscheinlich aus den Blastomeren des vierzelligen Stadiums entwickelt. In den andern Portionen, welche aus Lösung 1 genommen waren, bildeten sich einige wenige Blastulae. Die Eier, welche eine Stunde in dieser Lösung gewesen waren, waren alle ungeteilt, bis auf etwa eins von 1000, das sich

in 2 bis 3 Zellen geteilt hatte. Es war nicht viel besser mit der Portion Eier, welche 1 Stunde und 40 Minuten in derselben Lösung gewesen war. In der Portion, welche 2 Stunden und 45 Minuten sich in der Lösung befunden hatte, waren lebende Blastulae vorhanden, aber nicht so viele, wie in den zwei obenerwähnten Portionen. Es ist daher augenscheinlich, daß die Eier verschiedener Weibchen leichte Variationen bezüglich der erforderlichen Zeit aufweisen, welche die Eier in der Mischung von 60 ccm $\frac{2}{8}$ n. $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser bleiben müssen, um die Blastula-Stufe zu erreichen.

Ich habe bis jetzt nur von Eiern gesprochen, welche in Lösung 1 gewesen waren. Von den Eiern, welche in Lösung 2 gewesen waren, hatte sich keins zu einer Blastula entwickelt. Diejenigen, welche in dieser Lösung 2 Stunden verweilt hatten, hatten sich nicht einmal geteilt. Nur die Eier, welche in jener Lösung 2 Stunden und 45 Minuten geblieben waren, zeigten einen Anfang der Furchung (2 Zellen), aber nur 1 von 1000 hatte sich geteilt. Augenscheinlich waren entweder die Menge der Mg-Ionen oder der totale osmotische Druck der Lösung zu gering, um die Entwicklung der unbefruchteten Eier zu veranlassen. Diese Experimente mit negativen Resultaten sind jedoch sehr wertvoll als Kontrollexperimente betreffs einer möglichen Verunreinigung des Seewassers mit Spermatozoen. Wenn in solchen Fällen Verunreinigung

vorgekommen wäre, hätten die Eier, welche in Lösung 2 gewesen waren, sich ebensogut oder noch besser als jene entwickeln müssen, die in Lösung 1 waren. Dieselbe Bemerkung könnte auf die vorhergehenden und folgenden Experimente angewendet werden. Keins der Eier in irgend einer dieser Lösungen bildete eine Membran.

Vierte Reihe. — In allen Experimenten, in welchen Blastulae aus den unbefruchteten Eiern erzeugt wurden, waren drei Bedingungen vereinigt: (1) der osmotische Gesamtdruck der künstlichen Lösung war höher als der des Seewassers, (2) die Menge der Mg-Ionen war vermehrt, (3) die absolute Menge der im Seewasser normal vorhandenen andern Ionen war vermindert. In dieser vierten Folge wollte ich herausfinden, ob die dritte Bedingung wesentlich war, oder ob die bloße Verminderung des osmotischen Druckes nicht genügte. Überdies wollte ich gern die früheren Experimente noch einmal wiederholen. Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden in die folgenden Lösungen verteilt:

(1) 60 ccm $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser
(2) 100 „ Seewasser + $3^1/_2$ g (feuchtes) $MgCl_2$
(3) 100 „ Seewasser + 8 g (feuchtes) $MgCl_2$
(4) normales Seewasser.

In verschiedenen Zwischenräumen wurde eine Portion der Eier aus jeder der vier Lösungen genommen und in normales Seewasser gelegt. Die

Eier, welche 1 bis $1^1/_2$ und bis 2 Stunden in Lösung 1 gewesen waren, hatten sich am nächsten Morgen zu Blastulae entwickelt. Die Zahl der Blastulae war verhältnismäßig größer als in irgendeinem meiner früheren Experimente. Die Eier, welche in den Lösungen 2 und 3 gewesen waren, enthielten keine Blastulae. Lösung 2 ist, beiläufig bemerkt, die, welche Norman und Morgan bei ihren Experimenten verwendeten. In Lösung 4 war nicht einmal am nächsten Tag ein Ei geteilt. In keiner der vier Lösungen hatte irgendein Ei eine Membran gebildet. Diese Experimente zeigen, daß die Substituierung einer Anzahl Mg-Ionen für die Hälfte der naturgemäß im Seewasser enthaltenen Ionen weder notwendig, noch günstiger als der bloße Zusatz der Mg-Ionen ist. Dieses Experiment erklärt, warum es Morgan nicht gelang, lebende Larven zu erzeugen, nachdem er die Eier mit Lösung 2 behandelte. Aber ich beabsichtige, in meinen künftigen Experimenten zu entscheiden, ob der Zusatz von ein wenig mehr als $3^1/_2$ g $MgCl_2$ und ein wenig weniger als 8 g der Lösung auf 100 ccm Seewasser nicht günstigere Resultate geben kann.

Fünfte Reihe. — Zunächst wollte ich untersuchen, ob es nicht möglich wäre, die künstliche Entwicklung des unbefruchteten Eies einen Schritt weiterzuführen. Die bis jetzt erhaltenen Blastulae waren keineswegs gesund, und obgleich einige von ihnen normal aussahen, starben sie, ehe sie Zeit hatten, die

Pluteus-Stufe zu erreichen. Das letztere Resultat war ich geneigt, der giftigen Wirkung der Mg-Ionen zuzuschreiben, und es schien mir möglich, daß eine Verminderung in der Menge des $MgCl_2$ und eine geringe Vermehrung der Menge des Seewassers den Eiern erlauben würde, die Pluteus-Stufe zu erreichen. Die Eier von zwei Weibchen wurden in die folgenden Lösungen verteilt:

(1) 60 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser
(2) 50 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 50 ccm Seewasser
(3) normales Seewasser.

Die Eier wurden nach 1 Stunde und 5 Minuten, nach 1 Stunde und 30 Minuten und nach 1 Stunde und 40 Minuten in normales Seewasser zurückgebracht. Nur die Eier der letzten Portion, die 1 Stunde und 40 Minuten in der Lösung gewesen waren, zeigten den Anfang einer Furchung. Ich glaube, daß ich die Eier zu früh herausnahm. In einigen Fällen sind solche Eier imstande, sich zu entwickeln, aber in anderen sind sie es nicht, und ich halte es für wahrscheinlich, daß, wenn die Eier ein wenig länger in Lösung 1 und 2 geblieben wären, sie sich weiter entwickelt hätten.

Ich machte einige Aufnahmen mit der Kamera von der Art und Weise, wie die Eier geteilt waren (Fig. 2). Die aufeinander folgenden Stufen der Teilung ein und desselben Eies bis zur sechszelligen Stufe wurden aufgenommen. Der Leser wird aus den

Zeichnungen sehen, daß das Ei innerhalb 20 Minuten aus einem äußerlich ungeteilten Ei in ein sechszelliges Stadium überging. Augenscheinlich werden diese Zellteilungen von höchst auffallenden amöboiden Bewegungen begleitet, die für alle Eier ohne Membran charakteristisch sind. Ich glaube, daß diese amöboiden Bewegungen in den befruchteten Eiern gerade so gut existieren, aber die Membran verhindert, daß sie so

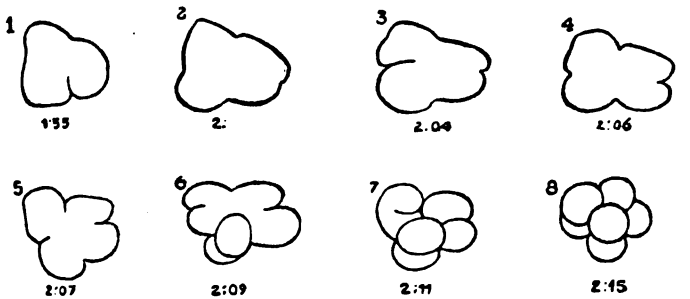


Fig. 2.

auffällig werden, wie bei den unbefruchteten Eiern, die keine Membran haben. Bei normalen Eiern sind diese amöboiden Bewegungen symmetrischer, und dies ist ein anderer Grund, warum sie unserer Beobachtung entgehen. Als ich meine ersten Experimente über die Wirkung konzentrierteren Seewassers auf die Teilung befruchteter Eier machte, kam mir der Gedanke, daß die „Knospenfurchung" das Sichtbarwerden der amöboiden Bewegungen sei, und bald nachher gab ich diesem Gedanken Ausdruck, daß dies im allgemeinen bei dem Prozeß der Zellteilung der Fall

sei[1]). Die zwei Kerne der Mutterzelle sind c Mittelpunkte, um welche das Protoplasma strömt u fließt. Diese amöboiden Bewegungen sind nur ei Episode in dem Prozeß der Zellteilung, als dess volle Erklärung eine andere Erscheinung von gänzli verschiedenem Charakter betrachtet werden muß.

Sechste Reihe. — Das vorhergehende Experime wurde wiederholt, aber diesmal mit Berücksichtigu der Tatsache, daß die Eier lange genug (2 Stunden) der künstlichen Lösung bleiben müssen. Die Eier v zwei Weibchen wurden in die drei Lösungen vertei

(1) 60 ccm $\frac{2}{3}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser
(2) 50 ccm $\frac{2}{3}$ n $MgCl_2$ + 50 ccm Seewasser
(3) normales Seewasser.

Keins dieser Eier bildete eine Membran. Einig welche in normalem Seewasser geblieben waren, teilt sich nach 20 Stunden in zwei oder drei Zellen, ab nicht weiter. Ich habe schon die Tatsache erwähn daß die unbefruchteten Eier verschiedener Weibch in ihrer Neigung zur Furchung in normalem Seewass etwas voneinander abweichen. Es kann möglic sein, daß diese Variationen die Wirkungen der küns lichen Lösungen auf die Entwicklung der unb fruchteten Eier erhöhen oder vermindern. Die Ei welche 2 Stunden lang in Lösung 1 gewesen war

[1]) Loeb, Archiv für Entwicklungsmechanik, Band I (189 S. 453.

entwickelten sich am nächsten Tage zu charakteristischen Blastulae, von denen einige hier dargestellt sind (Fig. 3.) Einige dieser Blastulae entsprangen möglicherweise aus der ganzen Masse eines Eies

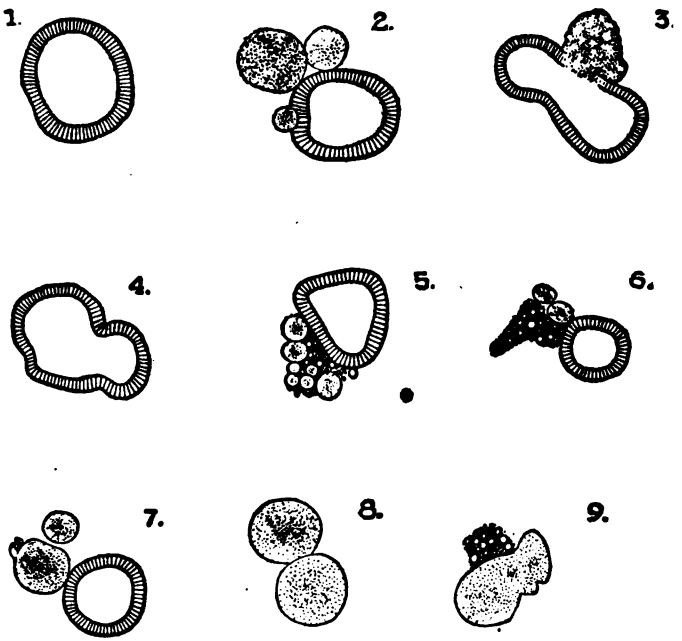


Fig. 3.

z. B. 1, 3 und 4. Aber sogar hier verrät der unregelmäßige Umriß deutlich, daß die Blastulae aus Eiern ohne Membran hervorgingen. Wie ich schon bei einem früheren Experiment sagte, wurden die Umrisse der Eier durch die amöboiden Bewegungen der Blastomeren unregelmäßig, und in der Blastula

ist der Umriß des unregelmäßigen Morula-Stadium bewahrt. Dies ist verständlich, wenn wir uns erinnern daß die Blastula aus den Furchungszellen, welch sich bewegen und an der Peripherie des Eies kleben entspringt.

Die andern Blastulae stellten nur kleinere Stück eines einzelnen Eies vor. In einigen Fällen zerfiel ei Teil des Eies und bildete an den andern Teil, welche die Blastula-Stufe erreichte, befestigte Bruchstück (5, 6 und 7). Jede von diesen Blastulae bewegt sich und mußte für die Kamera-Aufnahme unbeweg lich gemacht werden. Es ist unmöglich, einen richti gen Begriff der Verschiedenheit der Blastulae-Formen welche man bei solchen Experimenten sieht, zu geben Kein Ei dieser Portion (Lösung 1) erreichte di Pluteus-Stufe. Alle starben am zweiten Tag.

Die Eier, welche in Lösung 2 (gleiche Teile vo $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ und Seewasser) gewesen waren, sahe ganz anders aus als die vorhergehende Portio (Fig. 4). Nach 24 Stunden hatten sich viele vo ihnen zu Blastulae entwickelt. Diese Blastulae ließe keinen Zweifel aufkommen, daß sie aus Eiern ohn Membran stammten, insofern, als in den meiste Fällen mehrere Blastulae aus einem Ei hervorginge Vierlinge waren besonders häufig (Fig. 4, IV und V aber Zwillinge und Drillinge waren auch ganz ge wöhnlich. Ich beobachtete ihre Entwicklung un bin so ganz sicher, daß diese vielfachen zusammen

klebenden Embryonen aus einem Ei stammten. Das Merkmal, welches diese Embryonen von jenen, die mit der stärkeren $MgCl_2$-Lösung behandelt worden waren, unterschied, war jedoch die Tatsache, daß die ersteren alle regelmäßige und scharfe Umrisse hatten

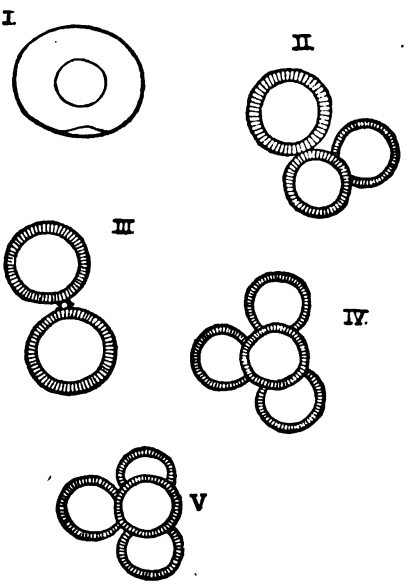


Fig. 4.

und frei von Bruchstücken waren. Die Umrisse der Blastulae waren vielmehr kugelförmig. Diese Blastulae hatten größere Lebenskraft als die andern und blieben während den nächsten 36 Stunden am Leben. Am nächsten Morgen hatte eine Anzahl derselben die Pluteus-Stufe mit vollkommen normalem Skelett und Darm erreicht, aber sie starben am folgenden Tage

(Fig. 5). Sie hatten mehr als 2 Tage gelebt. Ihre Entwicklung war langsamer, als es bei den befruchteten Eiern der Fall war.

Alle diese Blastulae und Plutei schwammen auf dem Boden der Schale umher, ohne sich an die Oberfläche zu erheben, wie die Larven von befruchteten Eiern.

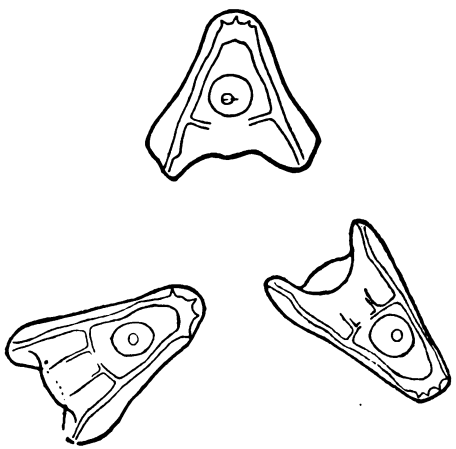


Fig. 5.

Die Kontroll-Eier, welche in normalem Seewasser gelassen wurden, blieben ungeteilt, mit Ausnahme einiger, welche sich am zweiten Tage in zwei oder drei Zellen teilten. Natürlich teilten sich die letzteren nicht weiter. Keins von diesen Eiern hatte eine Membran.

Siebente Reihe. Die vorhergehenden Reihen haben gezeigt, daß eine Mischung von gleichen Teilen von $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ und Seewasser günstiger für die Entwicklung

der Eier ist, als eine Mischung mit mehr $MgCl_2$ und weniger Seewasser, z. B. 60 ccm $MgCl_2$ und 40 ccm Seewasser. In der letzteren Mischung schienen die Eier mehr zu leiden. Es muß jedoch erwähnt werden, daß, insofern man die Zahl der Eier, welche in Entwicklung eintraten, vergleicht, die Lösung mit 60 ccm $MgCl_2$ und 40 ccm Seewasser ebensogut oder sogar noch besser ist, als die Mischung von gleichen Teilen. Nun versuchte ich, ob eine Mischung mit weniger $MgCl_2$ noch günstiger sein würde. Eine Mischung von 40 ccm $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ + 60 ccm Seewasser wurde unwirksam gefunden. Die Eier blieben zwei Stunden in dieser Lösung, einige derselben teilten sich nachher, aber da die Zahl verhältnismäßig klein war, verfolgte ich dies Experiment nicht weiter. Es ist möglich, daß eine Mischung von 40 ccm $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ + 60 ccm Seewasser zu schwach für die künstliche Parthenogenese des Arbaciaeies ist. In einem der vorhergehenden Experimente fanden wir, daß wir durch eine Behandlung der Eier mit einer Mischung von 30 ccm $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ + 60 ccm Seewasser nicht imstande waren, Parthenogenese hervorzubringen.

Achte Folge. Um aus dem unbefruchteten Ei der Arbacia Plutei zu erzeugen, müssen wir uns augenscheinlich auf Lösungen beschränken, welche weniger als 60 und mehr als 40% $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ enthalten. Bei den nächsten Experimenten wurden die folgenden vier Lösungen gebraucht:

(1) 55 ccm $\frac{2}{8}$ n MgCl + 45 ccm Seewasser
(2) 50 „ $\frac{2}{8}$ n MgCl + 50 „ „
(3) 45 „ $\frac{2}{8}$ n MgCl + 55 „ „
(4) normales Seewasser.

Zu verschiedenen Zeiten (2 Stunden, 2 Stunden und 10 Minuten, 2 Stunden und 20 Minuten) wurden Portionen der Eier aus diesen vier Lösungen genommen und in normales Seewasser zurückgebracht. Zwei Stunden später waren in jeder der Portionen, welche in den drei ersten Lösungen gewesen waren, ungefähr 50% der Eier in 2—16 Zellen geteilt. Keins von ihnen hatte eine Membran. In Lösung 4 (normales Seewasser) war kein Ei geteilt oder besaß eine Membran. Am nächsten Morgen waren unter den Eiern die in Lösung 1 gewesen waren, reichlich Blastulae. Viele von ihnen glichen den Blastulae Fig. 3, aber die Mehrzahl war rein und frei von Bruchstücken. Die Eier, welche in Lösung 2 gewesen waren, hatten eine große Zahl Blastulae und Gastrulae gebildet. Diese waren frei von Bruchstücken und sahen denen in Fig. 4 gezeichneten sehr ähnlich. Die aus Lösung 3 genommenen Eier zeigten sehr wenige Blastulae. Die letzteren waren jedoch vollkommen, ausgenommen daß das einzelne Ei in der Regel mehr als einen Embryo erzeugte. Die Mehrzahl der Eier befand sich noch im Morulastadium. Am nächsten Morgen, 48 Stunden nach der Behandlung mit der $MgCl_2$-Lösung, enthielt jede der drei Schalen vollkommene Plutei. Viele

Eier aus der Lösung 3, welche am vorhergehenden Tag noch im Morulastadium gewesen waren, hatten sich in der Zwischenzeit zu Blastulae oder Plutei entwickelt. Dieses Mal waren die Plutei noch am folgenden Tage lebendig (72 Stunden nach der Behandlung mit der künstlichen Lösung). Ihre Lebenskraft war nicht viel geringer als die der normalen Plutei, welche oft gerade so früh starben. Ich erwähnte, daß ich die Eier aus den $MgCl_2$-Lösungen in drei verschiedenen Zwischenräumen in normales Seewasser zurückgebracht hatte. Die zuletzt herausgenommenen ergaben die besten Resultate. Es ist sehr auffällig, daß die unbefruchteten Eier sich viel langsamer entwickeln, als die befruchteten Eier. Die letzteren erreichen die Pluteusstufe bei geeigneter Temperatur in 24 Stunden oder in etwas mehr Zeit, während die unbefruchteten Eier bei derselben Temperatur erst nach 48 Stunden die Pluteusstufe erreichen. Ich machte dieselbe Erfahrung bei allen meinen Experimenten mit unbefruchteten Eiern. Die Eier, welche in normalem Seewasser gelassen waren, blieben unentwickelt und nicht ein Ei hatte eine Membran. Ein Ei von 100 war nach 24 Stunden in zwei oder drei Zellen geteilt, aber keins entwickelte sich weiter.

Neunte Reihe. Dieses Mal beabsichtigte ich meine Experimente noch einmal zu wiederholen und zu gleicher Zeit Kontrollversuche von einem durchaus verschiedenen Charakter zu machen. Ich werde zuerst

über die Wiederholung der alten Experimente sprechen Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden in die folgenden zwei Lösungen gelegt:

(1) 50 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 50 ccm Seewasser

(2) normales Seewasser.

Zwei Stunden später wurden die Eier aus Lösung 1 in normales Seewasser zurückgebracht. Nach $3^1/_2$ Stunden waren ungefähr 50% der Eier, welche in Lösung 1 gewesen waren, in 2—16 Zellen geteilt, aber kein E hatte eine Membran. Die während der ganzen Zei in normalem Seewasser gebliebenen Kontrolleier waren alle ohne Membran und durchaus ungeteilt. Millionen von Eiern wurden unter dem Mikroskop untersucht Am nächsten Morgen hatten die in Lösung 1 gewesenen Eier die Blastulastufe erreicht und schwammen umher. Eine kleine Anzahl war im Gastrulastadium und begann sogar eine Pyramidalform anzunehmen Von den Kontrolleiern hatte sich keins entwickelt Vielleicht eins von 100 hatte amöboide Form, also eine solche, die der Furchung bei unbefruchteten Eiern vorangeht. Aber kein Ei war geteilt und keins hatte eine Membran. Am nächsten Tag hatten einige der Blastulae der anderen Portion die Pluteusstufe erreicht Die Kontrollexperimente werden in dem nächsten Paragraphen erörtert werden.

Mögliche Quellen des Irrtums und Einwände. Aus all diesen Experimenten ziehe ich den Schluß, daß die unbefruchteten Eier der Arbacia

wenn sie zwei Stunden lang in eine Lösung von 60 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser gelegt werden, sich zu Blastulae entwickeln, sobald sie in normales Seewasser zurückgebracht werden. Wenn wir die unbefruchteten Eier ungefähr zwei Stunden lang in eine Lösung von $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ und Seewasser legen, können sie die Pluteusstufe erreichen. Der mögliche Einwand könnte sein, daß die Eier befruchtet waren. Solche Befruchtung könnte nur durch die Instrumente oder Hände des Experimentators, der in Berührung mit Spermatozoen gewesen war, oder durch das Seewasser, welches Spermatozoen enthielt, verursacht worden sein. Die erste Möglichkeit war durchaus durch die obenerwähnten Vorsichtsmaßregeln ausgeschlossen. Die zweite war unmöglich gemacht, da erstens die natürliche Laichzeit vorüber war und zweitens die Spermatozoen in sehr kurzer Zeit (ungefähr fünf Stunden) ihr Vermögen, Eier zu befruchten, verlieren. Aber, daß es ganz ausgeschlossen war, wird durch folgende Tatsachen bewiesen:

1. Keins der in normalem Seewasser gehaltenen unbefruchteten Eiern entwickelte sich oder bildete eine Membran. Bei jedem Experiment untersuchte ich Millionen Eier. Nicht ein einziges befruchtetes wurde gefunden. Das in diesem Falle gebrauchte Seewasser war dasselbe wie das, welches für die unbefruchteten Eier, welche sich entwickelten, benutzt wurde. Wenn das Seewasser Spermatozoen enthalten hätte, müßten

die unbefruchteten Eier, welche die ganze Zeit in normalem Seewasser gehalten wurden, befruchtet worden sein.

2. Keins der Eier, welche sich nach der Behandlung mit der $MgCl_2$-Lösung entwickelten, hatte eine Membran. Befruchtete Eier, welche unmittelbar nach der Befruchtung in eine Mischnng von gleichen Teilen von $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ und Seewasser gelegt waren und darin zwei Stunden gehalten wurden, verloren ihre Membran nicht. In der neunten Folge machte ich folgende Kontrollexperimente: Unbefruchtete Eier, welche in der obenerwähnten $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$-Lösung zwei Stunden lang gewesen waren, wurden in normales Seewasser, dem frischer Samen zugesetzt war, gelegt. In diesem Falle bildete eine Anzahl der Eier Membranen.

3. Keine Blastula ging aus einem Ei hervor, welches einige Zeit in einer der folgenden Lösungen gehalten worden war:

(1) 100 ccm $\frac{1}{8}$ n $MgCl_2$
(2) 30 „ $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 70 ccm Seewasser
(3) 40 „ $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 60 „ „
(4) 100 „ Seewasser + $3^1/_2$ g (feuchtes) $MgCl_2$.

Dennoch entwickelten sich Eier desselben Weibchens, welches einige Zeit in einer Mischung von 50 oder 60 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ und 50 oder 40 ccm Seewasser gehalten worden war, zu Blastulae oder Plutei. Dies fand statt, trotzdem daß die Lebenskraft der letzt-

genannten Eier mehr gelitten hatte, als die Eier, welche in den oben erwähnten Lösungen mit mehr Seewasser und weniger $MgCl_2$ sich befunden hatten. Außerdem wurde das Wasser in beiden Klassen der Eier immer gleichzeitig gewechselt, und die Aussichten für Befruchtung der Eier durch in dem Seewasser enthaltenen Spermatozoen waren für beide gleich. Wenn das Seewasser irgend welche der Befruchtung fähige Spermatozoen enthalten hätte, hätten jene Eier, die in Lösungen mit weniger $MgCl_2$ gewesen waren, zuerst befruchtet werden müssen.

4. In beinahe all den Experimenten wurden die Eier zu verschiedenen Zeiten aus der Mischung von 60—50 ccm $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$ + 40—50 ccm Seewesser genommen. In keinem Falle entwickelte sich ein einziges Ei zu einer Blastula, das in dieser Lösung weniger als $^1/_2$ Stunde gewesen war, und im allgemeinen ergaben nur jene Eier Blastulae, welche in dieser Lösung ungefähr zwei Stunden sich aufgehalten hatten. Wenn das Seewasser Spermatozoen enthalten hätte, so müßten diese diejenigen Eier, welche eine kürzere Zeit in der künstlichen Lösung gewesen waren, zuerst befruchtet haben. Andererseits ergaben die Eier, welche in der künstlichen Lösung länger als $2^1/_2$ Stunden gelassen worden waren, in der Regel weniger oder keine Blastulae.

5. Weiter oben erklärte ich, daß sogar auf der Höhe der Laichzeit Eier selten durch Spermatozoen,

die sich im fließenden Seewasser befinden, befruchtet werden. Ich glaube nicht, daß man ein Ei von 1000 unter solchen Bedingungen sich entwickeln sehen könnte, vorausgesetzt, daß keine Verunreinigung durch die Instrumente stattfand. In unseren Experimenten, welche am Ende der Laichzeit gemacht wurden, entwickelten sich von den in der richtigen Lösung gehaltenen Eiern ungefähr 20—50%. Es ist außer Frage, daß ein solches Resultat den in dem Seewasser enthaltenen Spermatozoen nicht zugeschrieben werden darf.

6. Soweit ich sehen kann, gibt es nur noch eine mögliche Quelle des Irrtums. Es könnte sein, daß das Seewasser Spermatozoen enthielt, aber daß die Spermatozoen nicht imstande waren, normale Eier zu befruchten, während eine Behandlung des Eies mit der Mischung von 60 ccm $\frac{2}{8}{}^{0}$ n $MgCl_2$ + 40 ccm Seewasser die Empfänglichkeit für die Befruchtung erhöhte, oder eine Behandlung der Spermatozoen mit derselben Lösung deren befruchtende Kraft vermehrte. Doch muß der Gedanke an beide Möglichkeiten fallen gelassen werden. Soweit die Disposition des Eies zur Befruchtung in Betracht kommt, machte ich in den letzten Versuchsreihen folgende Experimente. Unbefruchtete Eier wurden in eine Lösung von 50 ccm $\frac{2}{8}{}^{0}$ n $MgCl_2$ + 50 ccm Seewasser gelegt und zwei Stunden lang darin gelassen. Sie wurden dann herausgenommen und mit frischen Spermatozoen befruchtet

Zu gleicher Zeit wurde eine andere Portion Eier desselben Weibchens, welches zwei Stunden in normalem Seewasser gehalten worden war, mit dem Samen desselben Männchens befruchtet. Annähernd jedes Ei der letzten Portion hatte sich zu einer Blastula entwickelt, während nur ungefähr 50% jener Eier, die in der $MgCl_2$-Lösung gewesen waren, die Blastulastufe erreichten. Also vermindert die Behandlung mit $MgCl_2$ die Entwicklungskraft der Eier und vermehrt sie nicht. Was nun die Spermatozoen betrifft, so zeigen frühere Experimente von Norman, Morgan und mir, daß eine geringe Vermehrung der Konzentration des Seewassers die Befruchtungskraft der Spermatozoen sehr schnell zerstört.

Bei meinen Experimenten setzte ich 2 g NaCl auf 100 ccm Seewasser hinzu. Die Spermatozoen, welche in dieser Lösung nur wenige Stunden verweilt hatten, befruchteten, als sie in normales Seewasser zurückgebracht wurden, nur ein Tausendstel oder noch weniger von den normalen Eiern, während die Spermatozoen desselben Tieres, welche in normalem Seewasser geblieben waren, zu derselben Zeit beinahe alle Eier befruchteten [1]).

Morgan wiederholte meine Experimente mit demselben Erfolg [2]). Morgan untersuchte die Wirkung

[1]) Loeb, Journal of Morphology, Band VII (1892) S. 253.
[2]) Morgan, Anatomischer Anzeiger, Band IX (1894) S. 141.

einer geringen Vermehrung des $MgCl_2$ auf Spermatozoen[1]). Ich wiederhole seine Darlegung:

8 Uhr 30 Min. brachte ich Samen in die $MgCl_2$-Lösung $2^1/_2$ g auf 100 ccm Seewasser. 8 Uhr 30 Min. wurde etwas Samen mit normalen unbefruchteten Eiern vermischt und innerhalb 3 Min. waren die Eier befruchtet. Um 8 Uhr 42 Min wurden Eier und Samen wieder gemischt. In 2 Min. wurden Eimembranen sichtbar, die also normale Befruchtung anzeigten und eine Minute später waren alle Eier befruchtet. 8 Uhr 52 Min wurde eine andere Probe gemacht. Aber diesmal erschien keine Eimembran, ein Beweis, daß Befruchtung nicht stattfand. Um 9 Uhr war ungefähr 1 Ei von 100 befruchtet.

Norman wiederholte diese Experimente mehrere Male mit demselben Erfolg, Sie beweisen, daß sogar ein geringer Zusatz von $MgCl_2$ zum Seewasser viel geringer als in irgend einem von unseren Experimenten, genügt, um die Befruchtungskraft der Spermatozoen in sehr kurzer Zeit zu vernichten. In meinen eigenen Experimenten war die Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers viel größer als in Normans Experimenten. In der neunten Reihe machte ich einen anderen Kontrollversuch, welcher dieselbe Frage behandelt. Unbefruchtete Eier wurden zwei Stunden lang in einer Lösung von gleichen Teilen $^2/_{80}$ n $MgCl_2$ und Seewasser gelassen. Am Ende dieser Zeit wurden sie in normales Seewasser zurückgebracht, welchem Samen, der auch zwei Stunden lang in einer Lösung von gleichen Teilen $^2/_{80}$ n $MgCl_2$ und Seewasser

[1]) Norman, Archiv für Entwicklungsmechanik, Band II (1896) S. 106.

gewesen war, zugesetzt wurde. Nur sehr wenige Eier bildeten eine Membran.

Es gibt, wie wir sahen, einen typischen Unterschied zwischen den Blastulae und Plutei, welche sich aus befruchteten und unbefruchteten Eiern entwickeln. Die ersteren erheben sich zur Oberfläche, die letzteren schwimmen auf dem Boden der Schale. Wenn Eier zwei Stunden lang in der $MgCl_2$-Lösung gehalten und dann mit normalem Samen befruchtet werden, erheben sich die Blastulae zur Oberfläche. Wenn sie mit Samen, der zwei Stunden lang in der $MgCl_2$-Lösung war, befruchtet werden, bleiben sie auf dem Boden der Schale wie die unbefruchteten Eier. So denke ich, ist es klar, daß sogar der letzte mögliche Einwand wiederlegt werden kann, nämlich, daß die Behandlung mit der $MgCl_2$-Lösung die Befruchtungskraft der Spermatozoen oder die Empfänglichkeit des Eies dafür erhöht. Daher ziehe ich den Schluß, daß die unbefruchteten Eier, welche mit gleichen Teilen von $\frac{20}{8}$ n $MgCl_2$ und Seewasser behandelt wurden, sich parthenogenetisch entwickelten.

V. Einige Bemerkungen in betreff der Natur des Befruchtungsprozesses.

Die Tatsachen der vorhergehenden Abteilung zwingen uns, das Problem der Befruchtung aus dem Reich der Morphologie in das der physikalischen Chemie zu versetzen. Es ist gewiß kein Grund übrig

geblieben, um den Befruchtungsprozeß als einen morphologischen zu definieren. Selbst die Morphologie der Spermatozoen ist von sekundärer Wichtigkeit, soweit sie den Befruchtungsprozeß betrifft.

Das Spermatozoon führt aber nicht nur die Entwicklung der nicht parthenogenetischen Eier herbei, sondern es ist auch der Träger der erblichen Eigenschaften des Männchens. Aus unseren Experimenten wird es offenbar, daß diese zwei Funktionen des Spermatozoons nicht notwendigerweise miteinander verbunden sind, denn niemand würde auch nur einen Augenblick annehmen, daß die erblichen von dem Spermatozoon übertragenen Eigenschaften dem Ei durch eine Veränderung der anorganischen Bestandteile des Seewassers mitgeteilt werden könnten. Wir haben gelernt, die verschiedenen Tätigkeiten einer Zelle verschiedenen Enzymen zuzuschreiben. Wir müssen in Zukunft die mögliche oder wahrscheinliche Trennung der befruchtenden Eigenschaften des Spermatozoen von der Übertragung erblicher Eigenschaften durch dasselbe in Betracht ziehen [1]).

Die aus dem unbefruchteten Ei erzeugten Plutei gleichen in jeder Hinsicht sehr den aus dem befruchteten Ei erzeugten. Die letzteren leben in vielen Fällen länger als die ersten, aber sogar dies war nicht in jedem Falle so, und es ist nicht unmöglich,

[1]) Loeb, Biological Lectures, Woods Hole 1899, Ginn & Co., Boston.

daß bei weiteren Experimenten parthenogenetische Plutei mit größerer Lebensdauer erzeugt werden können. Der einzige Unterschied zwischen parthenogenetischen und normalen Blastulae besteht darin, daß die letzteren sich zur Oberfläche erheben, während die ersteren es nicht tun. Man könnte denken, daß dies durch den Einfluß der $MgCl_2$-Lösung auf das Ei veranlaßt wird. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eier, welche in einer solchen Lösung gewesen waren und nachher befruchtet wurden, erhoben sich zur Oberfläche. Sogar dieser Unterschied könnte durch weiteres Experimentieren zum Verschwinden gebracht werden.

Ein Agens, welches das Ei veranlaßt, nur durch die ersten Stufen der Furchung zu gehen, die z. B. zu einer Teilung des Eies in zwei, vier oder acht Zellen führt, braucht nicht notwendigerweise viel mit jenen Agentien in den Spermatozoen, welche die Entwicklung des befruchteten Eies verursachen, gemein zu haben. Aber wenn das Ei durch einen künstlichen Einfluß veranlaßt werden kann, die Blastulastufe zu erreichen und umherzuschwimmen, muß die künstliche Ursache mehr mit dem wirksamen Element in dem Spermatozoon gemein haben. Wenn jedoch endlich die künstlichen Einflüsse das Ei veranlassen, die Pluteusstufe zu erreichen, oder mit anderen Worten, das Ei veranlassen, in seiner Entwicklung ebensoweit fortzuschreiten, wie das befruchtete Ei gegenwärtig in unserem Laboratorium entwickelt werden kann, glaube ich, daß die

beiden Prozesse der künstlichen und natürlichen Entwicklung sehr nahe miteinander verbunden sein müssen.

Es steht in Einklang mit unserer Darlegung, daß eine sehr große Zahl von Bedingungen ein unbefruchtetes Ei veranlassen, eine zwei- oder vierzellige Stufe zu erreichen. Es genügt, wenn man die Eier einige Zeit im Seewasser läßt (ungefähr 24 Stunden). Eine geringe Vermehrung der Alkalinität des Seewassers verursacht den Anfang einer Furchung viel eher. Eine kurze Behandlung mit Seewasser, das leicht angesäuert ist, hat dieselbe Wirkung. Eine Vermehrung in der Konzentration des Seewassers, welche wahrscheinlich einen Wasserverlust in dem Ei herbeiführt, hat dieselbe Wirkung (Morgan). Morgan[1]) fand neuerdings, daß eine Behandlung mit einer Lösung von Strychninsalzen zu dem Anfang einer Furchung führen kann. Möglicherweise wurde in diesem Falle die Alkalinität des Seewassers modifiziert. Aber keine von diesen oder andern oben erwähnten Methoden hat Blastulae, Gastrulae oder Plutei ergeben.

Bis jetzt ist nur ein Weg bekannt, wodurch das unbefruchtete Ei von Arbacia veranlaßt werden kann, sich zu einem Pluteus zu entwickeln[2]). Dieser besteht darin, daß man das unbefruchtete Ei zwei Stunden lang mit einer Mischung von gleichen Teilen einer

[1]) Morgan, Science, Band XI (1900) N. S. S. 176. R. Hertwig hatte dies schon vor vielen Jahren gefunden.

[2]) Ich konnte im Laboratorium die befruchteten Eier der Arbacia nicht über die Pluteusstufe hinausbringen.

$MgCl_2$-Lösung und Seewasser behandelt. Wie diese Behandlung möglicherweise auf die Eisubstanz wirken kann, ist von theoretischem Interesse. Die Hauptmasse unseres Protoplasmas besteht aus Eiweißkörpern, welche gemäß ihrem physikalischen Verhalten zu den kolloidalen Substanzen gehören. Die Eiweißkörper werden durch zwei Eigenschaften charakterisiert, welche von der größten Wichtigkeit in der Analyse der Lebenserscheinung sind. Die Eiweißkörper verändern ihren Aggregatzustand sehr leicht, und vollziehen sowohl Aufnahme wie Verlust von Wasser sehr rasch. Es ist mehr als wahrscheinlich, daß eine oder beide Eigenschaften die Muskelkontraktilität und die protoplasmatische Bewegung erklären können. Die Agentien, welche auf diese zwei veränderlichen Eigenschaften des Protoplasmas sehr stark einwirken, sind vor allen Dingen gewisse Enzyme (z. B. Plasmase, Trypsine usw.). Beinahe ebenso mächtig sind Ionen in gewissen Konzentrationen. Da ich bei diesem Punkt in drei vorhergehenden Aufsätzen verweilt habe, brauche ich es hier nicht zu wiederholen [1]). Aber ich wünsche, die Aufmerksamkeit auf eine sehr interessante Abhandlung von Dr. E. Pauli, welche kürzlich erschien und viel Licht auf diesen Gegenstand wirft, zu lenken [2]). Das dritte Agens ist die Temperatur.

---

[1]) Studies in general Physiol. Teil II, S. 539, 544 und 559.

[2]) Pauli, Archiv für die gesamte Physiologie, Band 78 (1899) S. 315.

In unsern Experimenten war es augensch
der zweite Faktor, welcher auf den Zustand de
loide einwirkte. Die vorübergehende Behandlu
unbefruchteten Eier mit einer Mischung von gl
Teilen einer $\frac{2}{8}\frac{0}{0}$ n $MgCl_2$-Lösung und Seewasser
eine Veränderung in den physikalischen Eigens
gewisser Kolloide hervor, welche durch Zurückb
in normales Seewasser nicht rückgängig gemach
und welche den Eiern erlaubt, sich zu normalen
zu entwickeln.

Was die Spermatozoen angeht, so können s
selbe Veränderung in der Beschaffenheit der K
des Eies herbeiführen, entweder, indem sie spe
Ionen in das Ei hineintragen oder Enzyme hineinb
oder in irgendeiner andern Weise, die uns no
bekannt ist. Es ist gewiß merkwürdig, daß die
matozoen eine große Menge Asche (5% gemäß
mersten) enthalten. In dem parthenogenetisc
sind die Kolloide von Anfang an in einem Zu
der die Fortsetzung der Entwicklung erlaubt.
dern Tieren ist es vielleicht nur die Bescha
der Ionen des Seewassers oder des Blutes,
die Eier an der parthenogenetischen Entwicklu
hindert. Ich werde diesen Punkt eingehender
bindung mit weiteren Experimenten über diesen
stand erörtern.

VI.

Über die künstliche Parthenogenese bei Seeigeln [1]).

In der letzten Oktobernummer des „American Journal of Physiology“ veröffentlichte ich eine vorläufige Notiz über die künstliche Erzeugung von Larven aus den unbefruchteten Eiern des Seeigels. Ich erwähnte, daß unbefruchtete Eier sich zu normalen Pluteis entwickeln könnten, nachdem sie ungefähr 2 Stunden lang in einer Lösung von gleichen Teilen einer $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$-Lösung und Seewasser gewesen waren. Die Kontrollexperimente, durch welche die Möglichkeit der Befruchtung dieser Eier durch Spermatozoen ausgeschlossen worden war, wurden kurz erwähnt. In der Aprilnummer derselben Zeitschrift wurde eine genaue Beschreibung meiner Experimente veröffentlicht, welche, wie ich glaube, jeden Zweifel in betreff der Möglichkeit eines Irrtums beseitigt. Nichtsdestoweniger entschloß ich mich, diese Experimente mit einer neuen Vorsichtsmaßregel, nämlich dem Gebrauch von sterilisiertem Seewasser, zu wiederholen. Durch die Güte der Vorsteher des Elisabeth Thompson Fond wurde

[1]) Science, Band XI (April 20, 1900) S. 612.

ich in den Stand gesetzt, weitere Experimente über künstliche Parthenogenese an der Pacificküste zu machen. Diese Experimente haben zu neuen Resultaten geführt, die in dem „American Journal of Physiology“ veröffentlicht werden sollen. Hier will ich mich auf eine Beschreibung der Vorsichtsmaßregeln beschränken, welche bei diesen Experimenten angewendet wurden, um die Möglichkeit einer Befruchtung der Eier durch Spermatozoen auszuschließen.

Das bei diesen Experimenten gebrauchte Seewasser wurde am Tage vorher sehr langsam bis zu einer Temperatur von 50—70° C erhitzt und ungefähr zehn Minuten lang bei dieser Temperatur erhalten, und dann sehr langsam abgekühlt. Die Kontrollexperimente bewiesen, wie zu erwarten war, daß die Spermatozoen durch diese Behandlung getötet werden. Während der Erhitzung des Wassers, wurde kein Seeigel im Laboratorium geöffnet, noch wurde einer dort verwahrt. Das sterilisierte Seewasser wurde in besonderen Flaschen und bedeckten Krügen, welche nur für diesen Zweck benutzt wurden, aufbewahrt. Ehe wir ein Experiment in Angriff nahmen, desinfizierten wir unsere Hände gründlich mit Seife und Bürste in derselben Weise, wie es bei einer chirurgischen Operation üblich ist. Jeder Seeigel wurde vor dem Öffnen einem starken Strome von Süßwasser ausgesetzt, und die ganze Oberfläche des Tieres so gründlich wie möglich in der sorgfältigsten Weise abgewaschen.

Dann wurde der Mund des Seeigels mit Scheren, die am Tage vorher in den Flammen sterilisiert und seitdem trocken gehalten worden waren, herausgeschnitten. Durch die Ausschneidung des Mundes wurden die Geschlechtsdrüsen bloßgelegt und durch ihre Farbe konnten wir bestimmen, ob das Tier ein Männchen oder ein Weibchen war. Wenn das erste Tier, welches geöffnet wurde, ein Weibchen war, wurden die Eingeweide mit sterilisierten Pinzetten entfernt und die größte Sorgfalt beobachtet, daß die Pinzetten nicht mit den Eierstöcken oder mit der Außenseite des Tieres in Berührung kamen. Nachdem der Darm entfernt und nichts darin gelassen war, als die Eierstöcke, wurde das Innere des Tieres wiederholt mit Süßwasser gefüllt und ausgewaschen. Dann wurde jeder der fünf Eierstöcke in toto mit einem sterilisierten Spatel herausgenommen, wobei besonders darauf geachtet wurde, daß die Eierstöcke weder mit der Oberfläche des Seeigels noch mit den Händen des Experimentators in Berührung kamen. Die Eierstöcke wurden zuerst in eine Schale mit Süßwasser gelegt, sorgfältig abgewaschen und dann in sterilisiertes Seewasser gebracht.

Eine Portion der Eier wurde in sterilisiertes Seewasser gelegt, um als Kontrollmaterial zu dienen. Eine zweite Portion kam in eine Mischung von gleichen Teilen sterilisierten Seewassers und einer $\frac{2}{8}\frac{0}{0}$ n $MgCl_2$-Lösung. Eine oder zwei Stunden später wurden diese

Eier aus dieser Mischung herausgenommen und in sterilisiertes Seewasser gelegt. Während 25% der letzteren Eier sich zu Blastulae entwickelten und am nächsten Tag umherschwammen, hatte sich nicht ein Ei des Kontrollmaterials geteilt. Wir brachten Stunden damit zu, dieses nach geteilten Eiern zu durchsuchen, aber fanden kein einziges.

Im Anschluß an diese Kontrollexperimente machten wir noch mehrere andere. Es war notwendig, die Mischung von gleichen Teilen $\frac{2}{3}$ n $MgCl_2$-Lösung und Seewasser ein bis zwei Stunden anzuwenden, um die Entwicklung von unbefruchteten Eier hervorzubringen. Wir machten den Versuch, eine Portion der Eier aus dieser Lösung viel früher herauszunehmen, in einigen Fällen nach 10 Minuten. In keinem Falle teilte oder entwickelte sich eins dieser Eier.

Eine dritte Reihe von Kontrollexperimenten wurde folgendermaßen angestellt. Lösungen mit weniger $MgCl_2$ und mehr Seewasser wurden versucht. In Lösungen von 30 ccm $\frac{2}{3}$ n $MgCl_2$ und 70 ccm Seewasser war kein Ei zur Entwicklung fähig.

Wenn das erste Tier, welches bei diesen Experimenten geöffnet wurde, ein Männchen war, wurden die Instrumente sogleich zur Desinfektion beiseite gelegt und das nächste Tier von einem andern Experimentator mit denselben Vorsichtsmaßregeln geöffnet.

Bei einigen Experimenten gebrauchten wir Seewasser, das durch ein neues Pasteurfilter gegangen

war. Obgleich keine Spermatozoen durch ein solches Filter gehen können, entwickelten sich die mit einer Mischung von gleichen Teilen einer $\frac{2}{8}\frac{0}{0}$ n $MgCl_2$-Lösung und filtriertem Seewasser behandelten Eier, während keine der Kontrolleier der Entwicklung fähig waren.

In einer der früheren Arbeiten erwähnte ich die Tatsache, daß die für künstliche Befruchtung gebrauchte Mischung die Spermatozoen in verhältnismäßig kurzer Zeit tötete und die Eier schädigte. Im Gegensatz zu der gewöhnlichen Annahme ist es eine Tatsache, daß Spermatozoen viel empfindlicher sind und eher als das Ei getötet werden.

Meine Experimente in Pacific Grove wurden mit Strongylocentrotus franciscanus und Strongylocentrotus purpuratus weitergeführt. Bei beiden Tieren kann künstliche Parthenogenese leicht ausgeführt werden.

Bei den Experimenten in Pacific Grove erfreute ich mich des wertvollen Beistandes von Herrn W. E. Garrey.

VII.

Weitere Experimente über künstliche Parthenogenese und die Natur des Befruchtungsprozesses[1]).

1. In meinen vorhergehenden Mitteilungen über das Wesen der Parthenogenese[2]) hatte ich mich darauf beschränkt, zu beweisen, daß die unbefruchteten Eier von Arbacia und Strongylocentrotus franciscanus und purpuratus einer Entwicklung zur Pluteusform fähig sind, wenn sie ein bis zwei Stunden in einer Mischung von gleichen Teilen einer $\frac{2}{8}$ n $MgCl_2$-Lösung und Seewasser gehalten werden. Die oben erwähnte Lösung, welche die künstliche Entwicklung des Eies hervorbringt, unterscheidet sich in drei Richtungen von der Beschaffenheit des normalen Seewassers. Erstens ist der osmotische Druck der Lösung höher als der des normalen Seewassers. Zweitens ist die Hälfte der in normalem Seewasser enthaltenen Salze entfernt. Es könnte möglich sein, daß das Seewasser Ionen enthält, die für die Entwicklung schädlich sind,

---

[1]) American Journal of Physiology, Band 4 (d. 1. Aug. 1900) S. 178. Diese Experimente wurden mit Hilfe des Elisabeth Thompson Science Fonds ausgeführt.

[2]) Teil II, S. 539, 576 und 624.

und daß die Entfernung dieser Ionen die Entwicklung der unbefruchteten Eier möglich macht. Drittens wird eine bedeutende Menge von $MgCl_2$ in Lösung gebracht, und möglicherweise üben die Mg-Ionen eine spezifisch anreizende („stimulierende") Wirkung auf die Entwicklung aus. Um die Natur des Befruchtungsprozesses zu bestimmen, war es notwendig, herauszufinden, welche von den drei Bedingungen für die Erzeugung künstlicher Parthenogenese wesentlich ist.

2. Ich habe schon in einer früheren Arbeit erwähnt, daß die Veränderung der Beschaffenheit des Seewassers allein, wenn sie nicht von einer Vermehrung des osmotischen Druckes begleitet ist, nur einige Teilungen des Eis bewirkt, aber nicht imstande ist, die parthenogenetische Erzeugung einer Blastula oder einer späteren Entwicklungsstufe zu verursachen. Die Erhöhung des osmotischen Druckes der Lösung ist daher eine wesentliche Bedingung für künstliche Parthenogenese. Da die günstige Jahreszeit zu Ende war, konnte ich vorigen Herbst nicht bestimmen, ob die zwei andern oben erwähnten Bedingungen ebenso wichtig sind. Mit Hilfe des Elisabeth Thompson Fond war ich imstande, Experimente unter Mitwirkung von Dr. W. E. Garrey in Pacific Grove während des Frühlings[1]) weiterzuführen,

[1]) Ich möchte Herrn Prof. Jenkins von Stanford University meinen Dank für die gütige Erlaubnis, das Hopkins-Laboratorium zu benützen, ausdrücken.

und seitdem hatte ich Gelegenheit, diese Arbeit in Woods Hole fortzusetzen. Meine neuen Resultate setzen mich instand, eine bestimmtere Antwort auf die Frage nach der Natur des Befruchtungsprozesses zu geben. Ich versuchte zuerst festzustellen, ob das $MgCl_2$ eine besondere Rolle in der künstlichen Parthenogenese spielt oder ob es durch ein anderes Salz vertreten werden kann. Ich fand, daß das letztere der Fall ist[2]). Eine Mischung von gleichen Teilen einer $\frac{1}{80}$ n NaCl-Lösung und Seewasser oder von gleichen Teilen einer $\frac{1}{80}$ n KCl-Lösung und Seewasser ist ebenso wirksam, wenn nicht wirksamer, als eine $\frac{2}{80}$ n $MgCl_2$-Lösung. Wenn unbefruchtete Eier von Strongylocentrotus 70 Minuten lang in irgend einer dieser Lösungen gelassen werden, entwickeln sie sich, und einige erreichen die Pluteusstufe. Solche Eier blieben 10 Tage lang lebendig. Sogar eine Mischung von gleichen Teilen einer $\frac{2}{80}$ n $CaCl_2$-Lösung und Seewasser brachte eine Entwicklung der Eier hervor, aber es war nötig, die Eier nach ungefähr 40—50 Minuten herauszunehmen, da sonst die Lösung sie tötete. Keins der mit der $CaCl_2$-Lösung behandelten Eier entwickelte sich über die Blastulastufe hinaus oder lebte länger als einen Tag.

[2]) Ich war in meinen ersten Experimenten von 1899 durch die Tatsache, daß die Lösungen, welche ich für isosmotisch hielt, in ihrer Konzentration verschieden waren, irre geführt worden, was auf einem Irrtum bei ihrer Herstellung beruhte. Als ich die Experimente 1900 wieder aufnahm, entdeckte ich den Irrtum und berichtigte ihn (1903—1906).

Ich bemerkte, daß bei diesen Experimenten mit einer $\frac{1}{80}$ n NaCl- oder KCl-Lösung nur eine verhältnismäßig kleine Zahl der Eier die Blastulastufe erreichte, sicherlich viel weniger als bei meinen vorhergehenden Experimenten mit $MgCl_2$ an Arbacia. Eine weitere Untersuchung zeigte die Tatsache, daß die $MgCl_2$-Lösung, welche ich gebraucht hatte, durch einen Irrtum oder ein Mißverständnis des Assistenten, der sie bereitete, schwächer war als eine $\frac{2}{80}$ n-Lösung. Sobald ich dies fand, fing ich mit verdünnterer NaCl- oder KCl-Lösung an zu experimentieren. Anstatt gleiche Teile einer $\frac{1}{80}$ n NaCl- oder KCl-Lösung und Seewasser zu gebrauchen, wendete ich folgende Mischungen an:

20 ccm $\frac{2}{80}$ n NaCl + 30 ccm destilliertes Wasser
+ 50 „ Seewasser

oder

17½ ccm $\frac{2}{80}$ n NaCl + 32½ ccm destilliertes Wasser
+ 50 „ Seewasser.

In beiden Fällen erreichten mehr Eier die Blastula- und Pluteusstufe als mit der ersten stärkeren Mischung. In einem Falle entwickelten sich unbefruchtete Eier sehr schön, nachdem sie zwei Stunden lang in einer Lösung von gleichen Teilen von 15 2½ n NaCl + 35 destilliertem Wasser + 50 Seewasser gewesen waren. Aber dies war beinahe die niedrigste Grenze für künstliche Parthenogenese bei Arbacia. In der Regel erreichten 25% oder noch mehr von den unbefruchteten Arbaciaeiern die Blastulastufe.

3. So wurde bewiesen, daß $MgCl_2$ keine beson dere Rolle bei der Erzeugung künstlicher Partheno genese spielt. Es blieb zu entscheiden, ob es vo wesentlicher Bedeutung ist, daß man einen Teil de normalen Bestandteile des Seewassers entfernt, ode ob die bloße Vermehrung des osmotischen Drucke genügt. Ich fand, daß die Erhöhung des osmotische Druckes des Seewassers vollständig genügt. Be den Experimenten, in welchen die Maximalzah der unbefruchteten Eier die Blastulastufe erreicht war ungefähr 1 g NaCl dem Seewasser zugeset worden. Wir können im Seewasser dieselbe Vermeh rung des osmotischen Drucks durch einen Zusat von 10 ccm der $2\frac{1}{2}$ n NaCl- oder $2\frac{1}{2}$ n KCl-Lösung[1] auf 90 ccm Seewasser erzeugen. In diesem Fall enthielt die Mischung alle Bestandteile des normale Seewassers. Wenn jedoch unbefruchtete Eier de Arbacia in einer solchen Lösung $1^1/_2$—2 Stunden ge lassen werden, so können 50% der Eier nach Zu rückbringen in normales Seewasser die Blastulastuf erreichen. Viele dieser Eier sterben im Blastula stadium und nur eine kleine Anzahl erreicht die Gastrula oder Pluteusstufe. Die Blastulae waren ähnlich wi die, welche ich in einer meiner früheren Abhand lungen beschrieben habe[2]). In den meisten Fälle

[1]) Meine $2^1/_2$ n NaCl-Lösung enthält pro Liter 146,25 g Die $2^1/_2$ n KlCl-Lösung enthielt 186,25 g pro Liter.

[2]) Stud. in gen. Phys. Teil II, S. 576.

entwickelt sich mehr als eine Blastula aus einem Ei. Ich habe schon ungefähr sechs sich bewegende Blastulae aus einem Ei hervorgehen sehen. In dem Ei von Arbacia ist die Disposition, mehr als einen Embryo entstehen zu lassen, größer als in dem Ei von Strongylocentrotus. Der Unterschied erklärt sich wahrscheinlich aus der Tatsache, daß sogar das unbefruchtete Ei des Strongylocentrotus oft eine feine Membran bildet, welche viel dünner ist als die durch den Eintritt des Spermatozoon erzeugte, jedoch genügt, um die Blastomeren zusammenzuhalten. Der Zusatz von NaCl oder KCl zum Seewasser begünstigt die Bildung dieser Membran.

4. In all den bis jetzt erwähnten Experimenten ist die Vermehrung des osmotischen Druckes durch den Zusatz von Elektrolyten bewerkstelligt worden. Dies könnte als ein Anzeichen betrachtet werden, daß die elektrisch geladenen Ionen im Seewasser eine gewichtige Rolle in der Erzeugung der Parthenogenesis bilden. Ich selbst war ursprünglich zu einer solchen Annahme geneigt. Ich habe mich jedoch überzeugt, daß eine Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers durch den Zusatz von Rohrzucker oder Harnstoff Parthenogenese erzeugen kann. Meine Lösung von Rohrzucker (Kristallzucker) war 2 n und enthielt 684·3 g in einem Liter, während die Ausgangslösung von Harnstoff $2\frac{1}{2}$ n war und 150·31 g in einem Liter enthielt. Ich fand, daß die unbefruchteten

Eier der Arbacia imstande waren, sich zu entwickeln nachdem sie $1^1/_2$—2 Stunden in einer der folgenden Lösungen gewesen waren:

(1) 100 ccm Seewasser + 25 2 n Rohrzucker

(2) $82\frac{1}{2}$ „ „ + $17\frac{1}{2}$ $2\frac{1}{2}$ n Harnstoff

Sowohl die Zuckerlösung wie die Harnstofflösung schadete den Eiern, die letztere aber viel mehr als die erstere. Ich machte den Versuch, Parthenogenesis dadurch zu erzeugen, daß ich unbefruchtete Eier eine reinen Zuckerlösung aussetzte, deren osmotischer Druck ungefähr gleich dem eines Seewassers war, welchem auf 90 ccm 10 ccm einer $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung zugesetzt worden war. Wenn die unbefruchteten Eier von Arbacia ungefähr zwei Stunden in eine Mischung von 60.2 n Rohrzucker und 40 destilliertes Wasser oder 55 2 n Rohrzucker + 45 destilliertes Wasser gelegt wurden, teilten sich viele von ihnen und einige entwickelten sich zu schwimmenden Blastulae, aber sie starben während der ersten 24 Stunden. Dies beweist unwiderleglich, daß die Entwicklung des unbefruchteten Eies durch eine Vermehrung der Konzentration der einschließenden Lösung erzeugt wird. Da es unwesentlich ist, ob die Vermehrung des osmotischen Druckes durch Elektrolyten oder Nichtleiter bewerkstelligt wird, ist es zweifellos, daß der Hauptfaktor der Vermehrung des osmotischen Druckes der

einschließenden Lösung ein Wasserverlust von seiten des Eies ist.

5. Da ich zu dem Schluß gekommen war, daß der Verlust von Wasser, oder besser der Verlust einer gewissen Wassermenge, die parthenogenetische Entwicklung des Eies verursacht, schien es möglich, noch einen Schritt weiter zu kommen. In allen vorhergehenden Experimenten wurden die unbefruchteten Eier 1—2 Stunden einer Lösung von höherem osmotischen Druck ausgesetzt und dann in normales Seewasser zurückgebracht, um sich zu entwickeln. Wenn der anfängliche Wasserverlust auf seiten des Eies alles wäre, was für die Erzeugung künstlicher Parthenogenese erforderlich ist, müßte es möglich sein, eine Lösung zu finden, welche nicht nur dem Ei Wasser entzieht, sondern ihm auch die Weiterentwicklung gestattet. Ich erinnerte mich aus meinen früheren Experimenten über die Wirkungen einer Vermehrung der Konzentration des Seewassers auf die Entwicklung[1]), daß eine Vermehrung der Konzentration des Seewassers, die gerade genügend ist, um Parthenogenese zu veranlassen, nach wenigstens 24 Stunden die Weiterentwicklung der Eier gestattet. Ich fand, daß, wenn wir unbefruchtete Eier dauernd in eine Mischung von 93 ccm Seewasser und 7 ccm 2½ n NaCl-Lösung legen, viele Eier sich in der Lösung entwickeln, und einige von ihnen sogar die Blastulastufe

[1]) Journal of Morphology, Band VII (1892) S. 253.

erreichen und umherschwimmen. Wenn wir ein Mischung von 90 ccm Seewasser und 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl Lösung gebrauchen, hört die Entwicklung früher auf, au dem einfachen Grunde, weil eine solche Lösung schäd licher ist. Diese Tatsachen zeigen deutlich, daß di Funktion der künstlichen Lösung für die Erzeugun der Parthenogenese darin besteht, daß sie dem E eine gewisse Wassermenge entzieht. In de meisten Fällen sind die Lösungen, welche eine solch Wirkung hervorbringen, zu gleicher Zeit zu schädlich um dem Ei eine Weiterentwicklung zur Blastula z erlauben. Dies ist der Grund, warum wir die Eie aus dieser Lösung herausnehmen und in normale Seewasser zurückbringen müssen, wenn wir wün schen, daß sie sich zu normalen Larven entwickeln

6. Eine Folge des Wasserverlustes von seiten de Eies ist eine Vermehrung seines osmotischen Druckes Der osmotische Druck im Innern des Eies wird haupt sächlich oder beinahe ausschließlich von Elektrolyte geliefert. So ist es nicht unmöglich, daß die Ione im Ei, wenn ihre Konzentration erhöht wird, jen Veränderung zustande bringen, welche das Ei veran laßt, sich zu entwickeln. Wenn wir annehmen, da das Spermatozoon die Entwicklung des Eies in der selben Weise in Angriff nimmt wie es der Fall be der künstlichen Parthenogenese ist, so folgt daraus daß das Spermatozoon mehr Salze oder einen höheren osmotischen Druck als die Eier besitzen muß

Wie ich in einer früheren Arbeit zeigte, scheint dies der Fall zu sein. Aber es gibt keinen Grund, warum das Spermatozoen nicht dieselben Wirkungen, welche wir durch Verminderung der Wassermenge im Ei erzeugen, in etwas anderer Weise hervorbringen sollte. Gegenwärtig jedoch muß das einzige Licht, welches auf die Natur des Befruchtungsprozesses geworfen werden kann, von einer Analyse über die Wirkungen eines Wasserverlustes auf das Ei erwartet werden.

Es scheint, als ob die Verflüssigung der Kernmembran und anderer Bestandteile des Kernes zuerst für die Zellteilung nötig wäre. Norman zeigte, daß eine gewisse Vermehrung der Konzentration des Seewassers eine Verteilung der Chromosomen in dem Ei hervorbringt. Morgans Beobachtungen stimmen damit überein. Aber alle diese Beobachtungen wurden mit Lösungen angestellt, deren osmotischer Druck bedeutend höher war, als der der in meinen Experimenten gebrauchten Lösungen. Neue Beobachtungen müssen herangezogen werden, um diese Frage zu entscheiden. Hoppe-Seyler weist in einer seiner Arbeiten darauf hin, daß ein Wasserverlust von seiten des Protoplasmas eine Verminderung in den Prozessen der Oxydation hervorbringt. Wir wissen, daß Mangel an Sauerstoff die Verflüssigung fester Bestandteile herbeiführen kann. Ich füge diese Bemerkungen für jene hinzu, welche sich für die spekulative Seite der Biologie interessieren. Aber im günstigsten Falle kann

eine Theorie uns nichts mehr geben als die Tatsachen, welche sie umfaßt, und es ist deshalb unsere Aufgabe, den Mangel an experimentellen Daten auf diesem Felde der Biologie auszufüllen, ehe wir anfangen können, Theorien zu machen.

7. Ich glaube, daß wir vor allen Dingen versuchen sollten, ob der Entwicklungsprozeß nur bei einigen wenigen Formen durch künstlich hervorgebrachten Wasserverlust eingeleitet werden kann, oder ob dieser Vorgang ein allgemeines Gesetz darstellt. Ich habe bis jetzt mit den Seeigeln Arbacia, Strongylocentrotus franciscanus und purpuratus Versuche angestellt. Jede dieser Formen ist osmotischer Parthenogenese fähig. Ich bin überzeugt, daß dies bei allen Arten von Seeigeln der Fall ist, obgleich die günstigste Vermehrung des osmotischen Druckes der einschließenden Lösung für verschiedene Formen variieren mag. Ich halte es für sehr wichtig, daß ich mit denselben Methoden imstande war, künstliche Parthenogenese bei einem Seestern (Asterias Forbesii) zu erzeugen. Wenn man die unbefruchteten Eier dieses Seesterns zwei Stunden lang in eine Mischung von 88 ccm Seewasser und 12 ccm einer $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung legt, können die Eier gezwungen werden, sich zu entwickeln und die Blastulastufe zu erreichen, falls sie in normales Seewasser zurückgebracht werden. Ich habe bis jetzt noch nicht die günstigste Bedingung für die parthenogenetische Entwicklung von Asterias gefunden, aber

die bis jetzt erhaltenen Tatsachen genügen, um festzustellen, daß eine gewisse Vermehrung des osmotischen Druckes der einschließenden Lösung (und ein Verlust einer gewissen Wassermenge in einem Teil des Eis) das Ei dieser Art veranlaßt, sich parthenogenetisch zu entwickeln. Ich habe an anderer Stelle[1]) die Vorsichtsmaßregeln und Kontrollexperimente erwähnt, welche angewendet wurden, um sich gegen die Gegenwart von Spermatozoen zu schützen. Ich halte es nicht für nötig, diese Darlegungen zu wiederholen, aber ich will noch eine neue Vorsichtsmaßregel erwähnen, für welche ich Herrn Gray, dem Kollektor des biologischen Seelaboratoriums verpflichtet bin. Herr Gray sucht die Weibchen vom Arbacia für meine Experimente aus, so daß ich bei all diesen späteren Experimenten kein Männchen im Laboratorium hatte. Kein Ei entwickelte sich in dem Kontrolmaterial. Alles bei diesen Experimenten gebrauchte Seewasser, wurde auf 70° C erhitzt.

Schlußfolgerungen.

Die Resultate meiner Experimente sind folgende:

1. Durch eine gewisse Vermehrung des osmotischen Druckes der einschließenden Lösung können die unbefruchteten Eier einiger (wahrscheinlich aller) Echinodermen (Arbacia, Strongylocentrotus, Asterias) ver-

[1]) Teil II, S. 576.

anlaßt werden, sich in normale Blastulae oder sogar Plutei zu entwickeln.

2. Diese Vermehrung des osmotischen Druckes kann ebensogut durch Elektrolyten als durch Nichtleiter erzeugt werden. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß die parthenogenetische Entwicklung dadurch veranlaßt wird, daß das Ei eine gewisse Wassermenge verliert.

VIII.

Experimente über künstliche Parthenogenese bei Anneliden (Chaetopterus) und die Natur des Befruchtungsprozesses[1]).

I. Einleitung und Methoden.

Meine vorhergehenden Abhandlungen über künstliche Parthenogenese[2]) hatten bewiesen, daß durch eine Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers die Eier vieler, wenn nicht aller Echinodermen veranlaßt werden können sich parthenogenetisch zu entwickeln. Zwei neue Probleme boten sich unmittelbar bei weiterer Betrachtung dar. Das eine war, parthenogenetische Larven bis zum Stadium der Differenzierung des Geschlechts zu züchten, um zu bestimmen, ob sie von einerlei Geschlecht sind oder nicht. Das zweite Problem war zu versuchen, ob künstliche Parthenogenese auf die Gruppe der Echinodermen beschränkt ist, oder ob sie eine allgemeinere Erscheinung ist. Da die Umstände für das Aufziehen von Seeigeln in Woods Hole in diesem Jahre nicht günstig waren, mußte das erste Problem verschoben werden.

[1]) American Journal of Physiology, Band IV (1901) S. 423.

[2]) Studies in general physiol. Teil II, S. 539, 576, 624 und 638.

Jedoch die Lösung des zweiten Problems war möglich und bestand in der Ermittlung, daß unbefruchtete Eier des Chaetopterus, eines Seeanneliden, veranlaßt werden können, sich zu schwimmenden, wimpertragenden Larven (Trochophoren) zu entwickeln. Ein kurzer vorläufiger Bericht über diesen Erfolg ist in der „Science“ [1] veröffentlicht worden.

Bei Experimenten über Parthenogenese ist die größte Vorsicht notwendig, um die Möglichkeit einer Verunreinigung der Eier durch Spermatozoen auszuschließen. Ich wählte absichtlich für meine weiteren Experimente Chaetopterus, da es bei diesem leicht möglich ist, Weibchen und Männchen zu unterscheiden und zu trennen. Wenn der Experimentator Weibchen und Männchen bei demselben Experiment mit denselben Instrumenten behandelt, ist es außerordentlich schwer eine Infektion der Eier durch Samen zu vermeiden. Ich verfuhr bei den Experimenten mit Chaetopterus in folgender Weise. Sobald die Tiere durch den Sammler in das Laboratorium gebracht waren, wurden die Röhren, in welchen sie leben, geöffnet und die Würmer entfernt. Sobald das erste Weibchen gefunden war, wurde es in eine besondere Schüssel gelegt und gründlichst mit Seewasser abgewaschen, welches 6 — 12 mal nacheinander erneuert wurde. Es wurde nachgewiesen, daß das Seewasser in dem Laboratorium absolut frei von Sperma-

[1]) Science, Band XII (1900) S. 170.

tozoen des Chaetopterus war. (Die Tiere werden in einiger Entfernung von dem Laboratorium am Ufer einer Insel gefunden.) Nachdem das Weibchen gewaschen war, wurde es während der Nacht einem Strome von Seewasser ausgesetzt, um, soweit wie möglich, jedes Spermatozoon zu entfernen, welches vielleicht noch auf der Oberfläche sein konnte. Am nächsten Tag war das Tier zum Experimentieren fertig. An diesem Tag vermied der Experimentator vor Beginn des Versuchs seine Hände in Berührung mit einem andern Chaetopterus oder mit dem Aquarium, das solche Tiere enthielt, zu bringen. Seine Hände und Instrumente wurden mit Süßwasser sterilisiert. Der hintere Teil des Tieres, welcher die Eier enthält, wurde abgeschnitten und zwei Minuten lang gründlichst in destilliertem oder Süß-Wasser gewaschen. Wäre irgend ein Spermatozoon auf der Oberfläche des Tieres geblieben, so würde das destillierte Wasser es getötet haben. Danach wurde der Teil, welcher die Eier enthält, in ein Gefäß mit sterilisiertem Seewasser gelegt, noch einmal abgewaschen und dann in ein anderes Gefäß mit sterilisiertem Seewasser gebracht. In dieser Schale wurden die einzelnen Parapodien nacheinander geöffnet, die Eier aus jedem mit einer Pipette herausgesaugt und dann in eine andere Schale mit sterilisiertem Seewasser gesammelt. Nachdem alle Eier gesammelt waren, wurden sie in zwei Portionen geteilt. Die eine Portion blieb in

normalem (sterilisiertem) Seewasser, um als Kon
material zu dienen. Die andere Portion wurde i
verschiedenen Lösungen verteilt, deren Wirkung
zu prüfen beabsichtigte. In keinem Falle sa
ein einziges Ei des Kontrollmaterials sic
einer Larve entwickeln. Ich bemerkte nur,
nach 7—10 Stunden einige dieser Eier einen A
von Furchung zeigen können, welche jedoch bal
hört. Diese Erscheinung scheint bei vielen See
ganz gewöhnlich zu sein. In einer früheren A
erwähnte ich, daß O. Hertwig dies schon als
gewöhnlichen Vorgang bei Arthropoden, Wür
und Echinodermen bemerkt hatte[1]). Wenn je
keine solche aseptische Maßregeln gegen Spermato
angewendet wurden, erreichte eine Anzahl Eier in
Kontrollmaterial gewöhnlich die Trochophoren
Das bei diesen Experimenten gebrauchte Seew
wurde durch langsames Erhitzen bis zu einer Te
ratur von 60—80° C sterilisiert. In einer kleinere
zahl von Experimenten gebrauchte ich Seewasser, we
durch einen Pasteur-(Chamberland-)Filter gega
war, was natürlich für Spermatozoen ganz und
dringlich ist[2]). Wenn für ein Experiment mehr

[1]) O. Hertwig, Die Zelle und die Gewebe, Bd. I (1893) S

[2]) In beinahe allen Experimenten wurde das gebra
Seewasser sterilisiert. In einigen Ausnahmefällen wurde
Vorsichtsmaßregel absichtlich unterlassen, um herauszufi
ob das Seewasser im Laboratorium Spermatozoen
Chaetopterus enthielt. Dies war jedoch nicht der Fall.

als solche von einem Weibchen gebraucht wurden, wurden alle Eier zuerst in einer Schale gesammelt, gründlichst gemischt und dann in zwei Portionen geteilt, eine um als Kontrollmaterial zu dienen und die andere, um in die verschiedenen Lösungen verteilt zu werden. So bestand das Kontrollmaterial und das Experimentiermaterial immer aus Eiern derselben Weibchen. Selbstverständlich war dies bei allen meinen früheren Experimenten über Seeigel auch der Fall.

II. Künstliche Parthenogenesis, welche durch eine Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers verursacht wurde.

Es war natürlich, daß ich zuerst versuchte, ob dieselben Mittel, welche die parthenogenetische Entwicklung bei Seeigeln verursachen, auch für eine parthenogenetische Entwicklung der Eier des Chaetopterus genügen.

Erste Reihe. Als ich das erste Material empfing, nahm ich sogleich ein Experiment in Angriff, obgleich ich wußte, daß es unmöglich war, die Verunreinigung durch Spermatozoen auszuschließen, wenn ich versuchte, die Eier, unmittelbar nachdem ich ein Männchen angefaßt hatte, zu isolieren. Das Weibchen wurde in sterilisiertem Wasser abgewaschen. Natürlich vermutete ich, daß dies nicht genügen würde, um Spermatozoen, welche an der Oberfläche des Tieres kleben konnten, zu beseitigen. Dennoch wur-

den die Eier genommen und in die folgenden fün Lösungen verteilt:

(1) 6 ccm 2½ n KCl + 94 ccm Seewasser
(2) 8 „ 2½ n KCl + 92 „ „
(3) 10 „ 2½ n KCl + 90 „ „
(4) 12 „ 2½ n KCl + 88 „ „
(5) normales Seewasser (Kontrolle).

Ein Teil der Eier blieb 1 Stunde und 25 Minuten die übrigen 1 Stunde und 40 Minuten in den Lö sungen. Das Experiment wurde am Nachmittag i Angriff genommen. Am nächsten Morgen[1]) fand ic zahlreiche schwimmende Larven (Trochophoren) i dem Material, das 1 Stunde und 25 Minuten in de ersten vier Lösungen gewesen war. In der zweite Portion waren sie weniger zahlreich. Aber sogar i dem Kontrollmaterial fand ich zwei schwimmend Trochophoren. Es folgte daraus, daß das Chaetop terusei entweder schon unter natürlichen Verhältnisse sich parthenogenetisch furchen kann, oder daß di Vorsichtsmaßregeln gegen den Eintritt der Spermato zoen nicht genügend waren.

Zweite Reihe. Von jetzt an wendete ich di streng antiseptischen Maßregeln gegen Spermatozoe

[1]) Ich werde in der folgenden Beschreibung der Experi mente nur in Betrachtung ziehen, ob schwimmende Trocho phoren gebildet wurden. Die morphologischen Einzelheite werden in Abschnitt V gegeben werden. Selbstverständlic befassen sich alle Experimente mit unbefruchteten Eiern, wen nicht das Gegenteil ausdrücklich bemerkt ist.

an, welche in der Einleitung beschrieben sind. Die folgenden Lösungen wurden gebraucht:

(1) 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 92 ccm Seewasser
(2) 10 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 „ „
(3) 12 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 88 „ „
(4) 12 „ $2\frac{1}{2}$ n NaCl + 88 „ „
(5) 20 „ $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ + 80 „ „
(6) normales Seewasser (Kontrolle).

Alles Seewasser war am vorhergehenden Tage durch Erhitzung bis zu einer Temperatur von 80° C sterilisiert worden; ein Teil (a) der Eier blieb 1 Stunde, ein zweiter Teil (b) 1 Stunde 20 Minuten in diesen Lösungen.

Die ersten vier Lösungen ergaben zahlreiche schwimmende Trochophoren; ihre Zahl war in den ersten zwei Lösungen am größten. Portion (a) der $MgCl_2$-Lösung ergab keine schwimmenden Blastulae, dagegen zeigte Portion (b) einige. Die Kontrolleier waren vollständig unentwickelt, abgesehen davon, daß nach 10 Stunden einige den Anfang einer Furchung zeigten, die in keinem Falle zur Bildung von mehr als 4—6 Zellen führte. Während der nächsten 48 Stunden fand keine weitere Entwicklung statt, die Eier starben und zersetzten sich. Nach diesem Experiment sind die unbefruchteten Eier des Chaetopterus nicht imstande sich in normalem Seewasser zu entwickeln. Sie können jedoch zur Entwicklung in Trochophoren veranlaßt werden, wenn sie eine Stunde lang Seewasser, dessen

Konzentration durch Zusatz der richtigen Menge vo KCl oder NaCl erhöht wurde, ausgesetzt werden.

Dritte Reihe. Die nächste Aufgabe war sich z vergewissern, um wie viel der osmotische Druck de Seewassers erhöht werden muß, um die parthenogene tische Entwicklung zu bewirken, und ob die für diese Zweck notwendige Vermehrung des osmotischen Drucke in jedem Falle dieselbe ist. Die angewandten Lö sungen waren folgende:

(1) 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 ccm Seewasser
(2) $12\frac{1}{2}$ „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + $87\frac{1}{2}$ „ „
(3) 30 „ 2 n Rohrzucker + 70 „ „
(4) $12\frac{1}{2}$ „ $2\frac{1}{2}$ n NaCl + $87\frac{1}{2}$ „ „
(5) normales Seewasser (Kontrolle).

Der osmotische Druck in den Lösungen 2, 3 un 4 war ungefähr derselbe. Die Eier blieben 65 Minute in diesen Lösungen und wurden dann in normale Seewasser zurückgebracht. Während eine große An zahl Eier, die in den Lösungen 1 und 2 gewese waren, sich zu Trochophoren entwickelten, erreichte sehr wenige Eier der Lösung 4 und keine der Lösung die Trochophorenstufe. Die Kontrolleier blieben un entwickelt.

Vierte Reihe. Die Resultate wären augenschein lich verwirrend, wenn die Vermehrung des osmotische Druckes der einzige Faktor wäre, der die Entwicklun der unbefruchteten Eier Chaetopterus zustande bringe kann. Aber sie würden verständlich sein, wenn auße

der Wirkung der Vermehrung des osmotischen Druckes noch eine besondere Wirkung der KCl oder der K-Ionen vorhanden wäre. Um dies zu bestimmen, wurden die unbefruchteten Eier eines Weibchens in die folgenden Lösungen verteilt:

(1) 5 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 95 ccm Seewasser
(2) 10 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 „ „
(3) 15 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 85 „ „
(4) 5 „ $2\frac{1}{2}$ n NaCl + 95 „ „
(5) 10 „ $2\frac{1}{2}$ n NaCl + 90 „ „
(6) 15 „ $2\frac{1}{2}$ n NaCl + 85 „ „
(7) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier blieben eine Stunde in diesen Lösungen.

Am nächsten Tage waren die Kontrolleier (7) unentwickelt. Die Eier, welche in den ersten drei Lösungen gewesen waren, waren voll von Trochophoren. In den Portionen 4 und 5 wurde nicht eine einzige schwimmende Trochophore gefunden, obgleich viele Eier angefangen hatten sich zu entwickeln. Die Entwicklung hörte jedoch in einem frühen Stadium auf. Von den Eiern, welche in Lösung 6 gewesen waren, hatte eine große Zahl die Trochophorenstufe erreicht und schwamm umher. Diese Resultate waren so deutlich, wie sie nur gewünscht werden konnten. Um künstliche Parthenogenesis durch den Zusatz von NaCl zu bewirken, mußten 15 ccm der $2\frac{1}{2}$ n-Lösung hinzugefügt werden, während 5 ccm einer $2\frac{1}{2}$ n KCl-Lösung genügend waren.

Fünfte Reihe. Es war möglich, daß die durch das NaCl erzeugte Wirkung eine besondere Na-Wirkung war und nicht die Wirkung des verstärkten osmotischen Druckes. Ein Experiment mit Rohrzucker konnte diese Frage entscheiden. Meine Lösung von Rohrzucker war eine 2 n-Lösung, während meine NaCl-Lösung $2\frac{1}{2}$ n war. Wegen der elektrolytischen Dissociation waren mehr als 30 ccm der Rohrzuckerlösung nötig, um dieselbe Vermehrung des osmotischen Druckes, zu erzeugen wie sie 15 ccm der $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung hervorbringen. Die folgenden Lösungen wurden versucht:

(1) 40 ccm 2 n Rohrzucker + 60 ccm Seewasser
(2) 20 „ 2 n „ + 80 „ „
(3) 10 „ 2 n „ + 90 „ „
(4) 10 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 „ „
(5) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier blieben 55 Minuten in den Lösungen. Acht Stunden später wurden schwimmende, wimpertragende Trochophoren unter den Eiern gefunden, welche in den Lösungen 1 und 4 gewesen waren. In Lösung 2 und 3 fanden sich keine schwimmenden Larven. In dem Kontrollmaterial waren alle Eier noch kugelig und ungeteilt. Am nächsten Morgen schwammen ungefähr 25% der Eier, welche in Lösung 1 gewesen waren, in lebendigster Weise umher. Einige Trochophoren wurden unter den Eiern, welche in Lösung 2 gewesen waren, gefunden. Aber die Kontrolleier

und die Eier, welche in Lösung 3 gewesen waren, erreichten im günstigsten Falle nur die frühesten Stufen der Furchung. Dies schließt jeden Zweifel aus, daß eine Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers genügend ist, um künstliche Parthenogenesis der Eier des Chaetopterus zu bewirken.

Sechste Reihe. Um diese Schlußfolgerung noch zwingender zu gestalten, war es nötig, die Wirkung einer Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers durch den Zusatz anderer Substanzen zu versuchen. Die folgenden wurden probiert:

(1) 5 ccm 5 n $CaCl_2$ + 95 ccm Seewasser
(2) 10 „ 5 n $CaCl_2$ + 90 „ „
(3) 10 „ $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ + 90 „ „
(4) 20 „ $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ + 80 „ „
(5) 30 „ $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ + 70 „ „
(6) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier blieben eine Stunde in diesen Lösungen und wurden dann in normales Seewasser zurückgebracht. Ich vergaß sie noch am selben Abend anzusehen. Am nächsten Morgen fand ich eine kleine Zahl schwimmender Larven unter den Eiern, die in Lösung 5 (30 ccm $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ + 70 ccm Seewasser) gewesen waren. Die Kontrolleier waren unentwickelt; die $CaCl_2$-Eier waren zerfallen. Das Experiment zeigte nur, daß diese Vermehrung des osmotischen Druckes durch $MgCl_2$ die Entwicklung der unbefruchteten Eier des Chaetopterus zustande bringen kann.

Siebente Reihe. Ich vermutete, daß an meinem Mißerfolg, aus einer Mischung von Seewasser und einer 5 n $CaCl_2$-Lösung schwimmende Trochophoren zu bekommen, die giftige Wirkung des Kalciums schuld sein könnte, da ich bei meinen früheren Experimenten über künstliche Parthenogenesis bei Seeigeln bemerkt hatte, daß die parthenogenetisch erzeugten Larven durch den Zusatz von $CaCl_2$ zum Seewasser bald starben. Deshalb machte ich früh am andern Morgen ein neues Experiment und beobachtete die Eier während des Tages. Ich fand in der Tat, daß eine Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers durch Zusatz von $CaCl_2$ zu der Bildung schwimmender Trochophoren aus den unbefruchteten Eiern des Chaetopterus führt. Die gebrauchten Lösungen waren folgende:

(1) $2\frac{1}{2}$ ccm 5 n $CaCl_2$ + $97\frac{1}{2}$ ccm Seewasser
(2) 5 „ 5 n $CaCl_2$ + 95 „ „
(3) 10 „ 5 n $CaCl_2$ + 90 „ „
(4) 15 „ 5 n $CaCl_2$ + 85 „ „
(5) 20 „ $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ + 80 „ „
(6) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier wurden diesen Lösungen 50 Minuten lang ausgesetzt. Nach 9 Stunden enthielten die Eier, welche in Lösung 3 gewesen waren, lebende Trochophoren, die während der Nacht starben. Keine der anderen Lösungen brachte schwimmende Trochophoren hervor.

Achte Reihe. Da jeder Zweifel beseitigt war, daß die Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers oder der Verlust einer gewissen Wassermenge von seiten des Eies die parthenogenetische Entwicklung der Eier des Chaetopterus bei diesen Experimenten verursachte, brauchte jetzt nur noch bestimmt zu werden, wie lange die Eier in den betreffenden Lösungen bleiben müssen, um sich zu entwickeln. Ich legte die unbefruchteten Eier eines Weibchens in eine Mischung von 85 ccm Seewasser + 20 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl. Die erste Portion wurde aus dieser Lösung nach 10 Minuten herausgenommen, die zweite nach 30, die dritte nach 60, die vierte nach 90, und die fünfte nach 120 Minuten. Am selben Abend (9 Stunden später) fand ich schwimmende Trochophoren unter den Eiern, welche der dritten und vierten Portion angehörten. Die Eier der ersten Portion zeigten zu dieser Zeit keine Spur von Entwicklung. Von den Eiern der zweiten Portion hatte ungefähr eins von hundert angefangen sich zu entwickeln. In der fünften Portion hatten die Eier augenscheinlich mit der Entwicklung begonnen, doch fand ich keine schwimmenden Larven. Die Eier waren möglicherweise durch ihr langes Verbleiben in dem konzentrierteren Seewasser geschädigt worden.

Am nächsten Morgen schwammen ungefähr 20 bis 40% der Eier der dritten und vierten Portion im

Trochophorenstadium umher. Die übrigen enthielten keine lebenden Larven, obgleich einige der Eier in den ersten Furchungsstufen sich befanden.

Es ist daher notwendig, die unbefruchteten Eier des Chaetopterus mehr als 30 und weniger als 120 Minuten in einer Mischung von 85 ccm Seewasser + 20 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl zu lassen, damit sie die Trochophorenstufe erreichen.

Schlußfolgerungen. Aus diesen Experimenten dürfen wir folgende Schlüsse ziehen:

1. Die unbefruchteten Eier des Chaetopterus erreichen die Trochophorenstufe nicht, wenn sie in normalem Seewasser gelassen werden, vorausgesetzt daß geeignete Vorsichtsmaßregeln gegen die Verunreinigung durch Spermatozoen getroffen werden. Solche Eier zeigen keine Veränderung während der ersten 7—9 Stunden, aber danach können sie anfangen sich zu teilen. In solchen Fällen geht in der Regel die Furchung nicht über das 2—4 zellige Stadium hinaus, aber ausnahmsweise kann sie bis zur 12 und 16zelligen Stufe gehen. Wir können sagen, daß Chaetopterus eine größere Neigung zur Parthenogenese besitzt, als Arbacia, deren Ei später anfängt sich zu teilen — ungefähr nach 20 Stunden — und nicht über die 2—4zellige Stufe hinausgeht.

2. Die unbefruchteten Eier des Chaetopterus können sich zu schwimmenden Trochophoren entwickeln, wenn sie ungefähr eine Stunde lang in eine der folgenden

Lösungen gelegt und dann in normales Seewasser zurückgebracht werden:

(1) 15—20 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl + 85 ccm Seewasser
(2) 40 „ 2 n Rohrzucker + 60 „ „
(3) 30 „ $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ + 70 „ „
(4) 10 „ 5 n $CaCl_2$ + 90 „ „

Alle diese Lösungen haben einen gemeinsamen Faktor ihrer Wirkung, nämlich eine fast gleiche Vermehrung des osmotischen Druckes. Es scheint deshalb gerechtfertigt anzunehmen, daß die Vermehrung des osmotischen Druckes, oder der Wasserverlust von seiten des Eies die Ursache der parthenogenetischen Entwicklung dieser Eier ist.

3. KCl oder vielleicht die K-Ionen scheinen eine spezifische Wirkung auf die Eier des Chaetopterus zu besitzen. Wir werden diese Tatsache in dem nächsten Abschnitt eingehender erörtern.

Betrachtung möglicher Einwände. Der mögliche Einwand, daß die Eier des Chaetopterus sich von Natur parthenogenetisch in normalem Seewasser verhalten, oder daß Spermatozoen das Seewasser verunreinigt hatten, wird durch das Verhalten der Kontrolleier und die angewendeten Vorsichtsmaßregeln widerlegt. So weit ich sehen kann, bleibt nur ein Einwand übrig, welcher, obgleich gesucht und höchst unwahrscheinlich, dennoch betrachtet werden soll. Es könnte daran gedacht werden, daß Chaetopterus hermaphroditisch ist, aber daß die Eier und

Spermatozoen nicht gleichzeitig reif werden. Dies verhindert die Befruchtung der Eier in normalem Seewasser. Aber die Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers könnte die Beweglichkeit oder Befruchtungskraft der Spermatozoen vermehren. Das Gegenteil ist jedoch richtig. Die Eier desselben Weibchens wurden in zwei Portionen geteilt. Die eine wurde in normales Seewasser gelegt, die andere 50 Minuten lang einer Mischung von 70 ccm Seewasser + 30 ccm $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ ausgesetzt. Ungefähr um dieselbe Zeit wurde der Samen eines Männchens in zwei Lösungen von genau demselben Charakter verteilt.

Nach 50 Minuten wurden die Eier, welche in normalem Seewasser gewesen waren, in drei Portionen geteilt. Zu der ersten Portion wurde Samen aus dem normalen Seewasser zugesetzt; zu der zweiten wurde Samen, der 50 Minuten lang in einer Mischung von 30 ccm $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$ + 70 ccm Seewasser gewesen war, hinzugefügt. Der dritten Portion wurde kein Samen zugesetzt; sie sollte als Kontrollmaterial dienen. Der Erfolg war so schlagend wie er nur gewünscht werden konnte. Während die Eier, zu welchen der Samen aus dem normalen Seewasser hinzugefügt war, sich ohne Ausnahme zu Trochophoren entwickelten, war nicht ein Ei von Portion 2, welcher der $MgCl_2$-Samen zugesetzt worden war, entwickelt. Die Kontrolleier blieben gleichfalls unentwickelt.

Eine Anzahl der unbefruchteten Eier, welche 50 Minuten lang in dem $MgCl_2$ gewesen waren, erreichten die Trochophorenstufe.

Dieses Experiment beweist entscheidend, daß die $MgCl_2$-Lösung die Befruchtungskraft der Spermatozoen vernichtet oder wenigstens vermindert. In einer vorhergehenden Folge von Experimenten war ich imstande zu zeigen, daß dasselbe bei den Eiern des Seeigels der Fall ist.

Außerdem überzeugte ich mich durch mikroskopische Untersuchungen, daß die benutzten Weibchen nicht hermophroditisch waren.

III. Die spezifische Wirkung der K-Ionen auf die Entwicklung der unbefruchteten Eier des Chaetopterus.

Die vorhergehenden Experimente schienen anzudeuten, daß das KCl eine spezifische Wirkung auf die Entwicklung der unbefruchteten Eier des Chaetopterus hat. Mead hatte schon gefunden[1]), daß wenn $\frac{1}{2}$% KCl dem Seewasser zugesetzt wird, die unbefruchteten Eier von Chaetopterus ihre Polkörperchen ausstoßen, während der Zusatz von $\frac{1}{2}$% NaCl zum Seewasser keine solche Wirkung erzeugt. Es schien mir interessant zu sein herauszufinden, ob die K-Ionen möglicherweise imstande wären, die parthenogenetische

[1]) Mead, Biologische Vorträge, Woods Hole, 1898 (Boston, Ginn & Co.).

Entwicklung der Chaetopteruslarven zu verursachen, ohne daß der osmotische Druck des Seewassers erhöht wurde.

Neunte Reihe. Die folgenden Mischungen wurden angesetzt:

(1) 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 ccm Seewasser
(2) 5 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 95 „ „
(2) $2\frac{1}{2}$ „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 98 „ „
(4) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier blieben eine Stunde in den Lösungen. Das Seewasser, welches gebraucht wurde, war durch Erhitzen bis zu einer Temperatur von 80° C sterilisiert worden, wie bei all den vorhergehenden Experimenten. Am nächsten Morgen enthielt jede von den drei ersten Portionen frei schwimmende Larven, während im Kontrollmaterial keine vorhanden waren.

Zehnte Reihe. Ich beabsichtigte die Minimummenge von KCl herauszufinden, welche notwendig ist, um künstliche Parthenogenese zustande zu bringen. Überdies wollte ich gern wissen, ob der Zusatz von KCl zum Seewasser nicht schneller auf die Eier einwirkte, als eine Vermehrung des osmotischen Druckes durch irgend eine andere Substanz. Sieben Lösungen wurden gebraucht:

(1) $\frac{1}{2}$ ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + $99\frac{1}{2}$ ccm Seewasser
(2) 1 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 99 „ „
(3) 2 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 98 „ „

(4) 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 ccm Seewasser
(5) 1 „ $2\frac{1}{2}$ n NaCl + 99 „ „
(6) 2 „ $2\frac{1}{2}$ n NaCl + 98 „ „
(7) normales Seewasser (Kontrolle).

Eine Portion der Eier blieb 5—10 Minuten in diesen Lösungen, die andern 60—70 Minuten.

Die Resultate waren folgende. Keine der zwei Portionen, welche in Lösung 1 gewesen waren, erreichten die Trochophorenstufe. Keins der Eier, welche nur 5 Minuten in der zweiten Lösung gewesen waren, erreichten das Trochophorenstadium. Aber die Portion der Eier, welche eine Stunde in der zweiten Lösung geblieben war, ergab eine kleine Anzahl schwimmender Trochophoren. Die Eier, welche in den Lösungen 3 und 4 gewesen waren, unterscheiden sich außerordentlich von den vorhergehenden Portionen. Sie waren voll von schwimmenden Trochophoren, und zwar sowohl jene, die 5 Minuten, als auch die, welche eine Stunde in den Lösungen gewesen waren.

Die Kontrolleier und die Eier der Portionen 5 und 6 entwickelten sich nicht, obgleich eine Anzahl die ersten Stadien der Furchung durchmachten.

Ich hatte bei meinen früheren Experimenten beobachtet, daß die Eier des Seeigels sich parthenogenetisch entwickeln können, wenn sie dauernd in Seewasser, dessen Konzentration nur wenig erhöht ist, gelassen werden. Wenn die Eier der Seeigel zwei Stunden lang in eine Mischung von 92 ccm Seewasser

+ 8 ccm 2½ n NaCl gelegt werden, so können sie sich nicht zu Blastulae entwickeln, wenn sie in normales See wasser zurückgebracht werden. Aber wenn sie einige Zeit oder dauernd in einer solchen Lösung gelassen werden, kann eine kleine Anzahl Blastulae gebildet werden. Eine Anzahl der unbefruchteten Chaetopterus eier wurden dauernd in den Lösungen 1—6 gelassen. Am nächsten Morgen hatten die Eier, welche in Lösung 2 (1 KCl + 99 ccm Seewasser) gelassen waren schwimmende Trochophoren. Die Eier in Lösung erreichten nicht das Trochophorenstadium. In den andern Lösungen war alles tot.

Elfte Reihe. Diese Serie war eine Wiederholung der vorhergehenden, mit der Ausnahme, daß die Eier 20—30 Minuten in den nun folgenden Lösungen gelassen wurden:

(1) 1 ccm 2½ n KCl + 99 ccm Seewasser
(2) 1½ „ 2½ n KCl + 98½ „ „
(3) 2 „ 2½ n KCl + 98 „ „
(4) 10 „ 2½ n KCl + 90 „ „
(5) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier, welche in Lösung 1 gewesen waren bildeten sehr wenige schwimmende Trochophoren, jene, welche in Lösungen 2 und 3 gewesen waren dagegen viele und die in Lösung 4 gewesenen noch viel mehr. Die Kontrolleier waren meistens unentwickelt; eine kleine Anzahl war in 2—16 Zellen geteilt.

Zwölfte Reihe. In den bis jetzt erwähnten Experimenten war eine $2\frac{1}{2}$ n KCl-Lösung dem normalen Seewasser zugesetzt worden. Da der osmotische Druck des Seewassers ungefähr der gleiche ist, wie der einer $\frac{5}{8}$ n KCl-Lösung, war bei all diesen Experimenten mit KCl der osmotische Druck des Seewassers erhöht worden. Nun wollte ich gern versuchen, ob diese Vermehrung des osmotischen Druckes für die KCl-Wirkung wesentlich ist, oder ob eine bloße Vermehrung der Zahl der K-Ionen ohne eine Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers die parthenogenetische Entwicklung der Eier des Chaetopterus bewerkstelligen kann. Folgende Lösungen wurden versucht:

(1)	2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl	+ 91 ccm	Seewasser
		+ 7 „	destilliertes Wasser
(2)	3 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl	+ 86 „	Seewasser
		+ 11 „	destilliertes Wasser
(3)	2 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl	+ 98 „	Seewasser
(4)	3 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl	+ 97 „	„
(5)	5 „ $2\frac{1}{2}$ n $MgCl_2$	+ 95 „	„
(6)	normales Seewasser (Kontrolle).		

Die Eier blieben in der Lösung 55 Minuten. Neun Stunden später am selben Abend wurden schwimmende Trochophoren unter den Eiern gefunden, welche in den ersten vier Lösungen gewesen waren. Die Eier, welche in den zwei anderen Lösungen sich befunden hatten, entwickelten sich gar nicht. Einige von den

in den Lösungen 1 und 2 gelassenen Eiern erreichten die Trochophorenstufe und schwammen umher.

Am nächsten Morgen bestätigten sich diese Resultate. Ein volles Drittel aller Eier, die 55 Minuten in den Lösungen 1—4 gewesen waren, schwammen als Trochophoren umher. Die Eier, welche in den Lösungen 5 und 6 gewesen waren, hatten nicht die Trochophorenstufe erreicht; nur einige wenige von ihnen hatten angefangen sich zu teilen.

Dreizehnte Reihe. Es war offenbar, daß das KCl künstliche Parthenogenese bewerkstelligte, sogar wenn der osmotische Druck des Seewassers nicht erhöht war. Nun versuchte ich, ob eine reine KCl-Lösung imstande wäre, künstliche Parthenogenese zu erzeugen und ob dies möglich wäre, wenn der osmotische Druck einer solchen Lösung niedriger war, als der des Seewassers. Die folgenden Lösungen wurden gebraucht:

(1) 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 ccm destilliertes Wasser
(2) 20 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 80 „ „ „
(3) 25 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 75 „ „ „
(4) 2 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 98 „ Seewasser
(5) normales Seewasser (Kontrolle).

Der osmotische Druck der Lösungen 1 und 2 war geringer als der des normalen Seewassers. Eine Portion wurde 13, die andere 50 Minuten in diesen Lösungen gelassen.

Am nächsten Morgen wurde eine große Zahl schwimmender Trochophoren in jeder der Schalen gefunden, welche Eier enthielten, die aus den ersten vier Lösungen genommen waren. Die Kontrolllösungen waren ganz frei von Trochophoren.

Vierzehnte Reihe. Das Experiment war so überraschend, daß ich es zu wiederholen wünschte. Es wurden folgende Lösungen angesetzt:

(1) 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 ccm destilliertes Wasser

(2) 2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 98 ccm Seewasser

(3) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier wurden 50 Minuten lang in den Lösungen gelassen. Das Wasser war sterilisiert. Am nächsten Morgen befanden sich unter den Eiern, die in den Lösungen 1 und 2 gewesen waren, lebende Larven, während die Eier in normalem Seewasser unentwickelt waren.

Fünfzehnte Reihe. Nun wünschte ich zu wissen, ob die KCl-Lösung noch mehr verdünnt werden könnte ohne ihre Wirkung auf die unbefruchteten Chaetopteruseier zu zerstören. Hierzu wurden vier Lösungen gebraucht:

(1) 5 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 95 ccm destilliertes Wasser

(2) 10 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 90 „ „ „

(3) 15 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 85 „ „ „

(4) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier wurden in diesen Lösungen 7 Minuten gelassen und dann in sterilisiertes Wasser zurückgebracht. Am nächsten Morgen schwammen 1% der Eier, welche in Lösung 1 gewesen waren, umher. Die Eier, welche in Lösung 2 gewesen waren, hatten fast alle die Larvenstufe erreicht, obgleich nicht alle von ihnen umherschwammen. Die Eier, welche in der 3. Lösung gewesen waren, enthielten schwimmende Larven, aber weniger als die zwei anderen Portionen. Die Kontrolleier waren während der ersten 9—10 Stunden ganz ungeteilt geblieben. Sie zeigten jedoch am nächsten Morgen einen Furchungsanfang (2—3 Zellen).

Sechzehnte Reihe. Es unterliegt keinem Zweifel mehr, daß KCl imstande ist, die Entwicklung der unbefruchteten Eier des Chaetopterus zu bewerkstelligen. Es war übrigens aus Experiment 10 zu ersehen, daß wenn nur $\frac{1}{2}$ ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl zu $99\frac{1}{2}$ ccm Seewasser zugesetzt wird, keine Trochophoren gebildet werden. Daraus kann man natürlich schließen, daß eine gewisse Minimalmenge der K-Ionen in das Ei eindringen muß, um es zur Bildung des Trochophorenstadiums zu veranlassen. Um eine Entscheidung herbeizuführen, wurde folgendes Experiment angestellt. Die Eier eines Weibchens wurden in eine Lösung von 2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 98 ccm Seewasser gelegt und einzelne Portionen in verschiedenen Zwischenräumen in normales Seewasser zurückgebracht, nämlich, nach einer Minute, drei Minuten, sieben Minuten, neun Minuten, 13 Mi-

nuten, 20 Minuten, 40 Minuten. Die Resultate dieses Experimentes waren so entscheidend, wie es nur gewünscht werden konnte.

Die Eier der ersten Portion (welche nur eine Minute in dem KCl-Seewasser gewesen waren) waren noch nach 9—10 Stunden ganz ungeteilt. In der zweiten Portion (drei Minuten) fanden sich einige Eier gefurcht, aber es kam zu keiner Bildung von Trochophoren. Portion fünf (13 Minuten) enthielt Trochophoren, welche sich aber nicht bewegten, und in Portion sechs (20 Minuten) und Portion sieben (40 Minuten) wurden Trochophoren gefunden, welche gerade anfingen sich zu bewegen. Die Kontrolleier waren durchaus ungeteilt.

Am nächsten Morgen fand ich keine Trochophoren in der ersten Portion (eine Minute) aber viele Eier in einem 2—8zelligen Stadium. In Portion zwei (drei Minuten) schwammen ungefähr 1% der Eier als Trochophoren umher. In Portion vier schwammen ungefähr 10% aller Eier als Trochophoren umher; in Portion fünf (13 Minuten) war es ungefähr dasselbe. In Portion sechs, deren Eier 20 Minuten lang in dem KCl-Seewasser gewesen waren, schwammen ungefähr 50% in dem Trochophorenstadium umher. Portion sieben schien nicht ganz so viele Trochophoren zu enthalten.

Es ist also notwendig, daß die unbefruchteten Eier länger als eine Minute in einer Mischung von

2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 98 ccm Seewasser bleiben, um sich zu entwickeln. Drei Minuten (oder möglichenfalls sogar etwas weniger) ist genügend. Dies zeigt deutlich an, daß eine gewisse Menge von K oder KCl in das Ei dringen muß, um die Entwicklung herbeizuführen. Diese Menge ist sehr gering. Es scheint jedoch ein für die einzelnen Eier individuelles Variieren möglich insofern als die Zahl der Eier, welche sich entwickelte, größer wurde, je länger die Eier in der KCl-Lösung blieben. Wenn sie zu lange in solch einer Lösung bleiben, wirkt das KCl wie ein Gift. 20—60 Minuten scheint die günstigste Zeit zu sein.

Siebzehnte Reihe. Ich wollte noch einmal bestimmen welches die kleinste Menge des KCl wäre, die dem Seewasser zugesetzt werden muß, um künstliche Parthonegenese der Chaetopteruseier herbeizuführen. Folgende Lösungen wurden versucht:

(1) $\frac{1}{2}$ ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + $99\frac{1}{2}$ ccm Seewasser
(2) 1 „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + 99 „ „
(3) $1\frac{1}{2}$ „ $2\frac{1}{2}$ n KCl + $98\frac{1}{2}$ „ „
(4) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier wurden über Nacht in diesen Lösungen gelassen. Am nächsten Morgen, nachdem sie 24 Stunden in diesen Lösungen gewesen waren, enthielt die erste Lösung viele Eier in den Anfangsstadien der Furchung, aber es konnte nicht eine schwimmende Larve entdeckt werden. Die zweite und dritte Lösung enthielten eine große Menge schwimmender Larven; in

der zweiten waren sie zahlreicher als in der dritten. Im Kontrollmaterial fingen nur wenige Eier an sich zu teilen. Hier konnten keine schwimmenden Larven gefunden werden. Dies bestätigt unsere frühere Beobachtung, daß ein Zusatz von ½ ccm 2½ n KCl auf 99½ ccm Seewasser ungenügend ist um Parthenogenese zu erzeugen, während der Zusatz von 1 KCl genügt.

Achtzehnte Reihe. Es liegt etwas Paradoxes in der Tatsache, daß der Zusatz von 2 ccm 2½ n KCl auf 98 ccm Seewasser in drei Minuten Parthenogenese erzeugen kann, während der Zusatz von ½ ccm 2½ n KCl auf 99½ ccm Seewasser dasselbe Resultat in 24 Stunden nicht herbeizuführen vermag. Ehe ich dies als eine Tatsache annahm, wollte ich es noch einmal bestätigt sehen. Dieselben Lösungen, wie vorher, wurden angewendet:

(1) ½ ccm 2½ n KCl + 99½ ccm Seewasser
(2) 1 „ 2½ n KCl + 99 „ „
(3) 1½ „ 2½ n KCl + 98½ „ „
(4) normales Seewasser (Kontrolle).

Ein Teil der Eier wurde nach 30 Minuten in normales sterilisiertes Seewasser zurückgebracht, während die anderen noch während der nächsten 24 Stunden in der Lösung blieben. Bezüglich der letzteren waren die Resultate genau dieselben, wie die in dem vorhergehenden Experiment beschriebenen. Die Eier, welche über Nacht in Lösung 1 geblieben waren,

hatten sich nicht über die ersten Furchungsstufen entwickelt. Kein Ei erreichte das Trochophorenstadium. In der zweiten Lösung wurden eine große Menge schwimmender Larven gefunden, und in der dritten Lösung waren sie sehr zahlreich. Ungefähr 75% aller Eier waren in dem Trochophorenstadium, und viele von ihnen schwammen umher.

Die Eier, welche in diesen Lösungen nur 30 Minuten geblieben waren, zeigten am nächsten Morgen folgenden Zustand: Die, welche 30 Minuten in der ersten Lösung gewesen waren, zeigten keine Trochophoren; nur einige hatten angefangen sich zu teilen. Die Eier, welche nach 30 Minuten aus Lösung 2 genommen waren, hatten viel Larven gebildet, aber weniger, als die Eier, welche in der Lösung geblieben waren. Diejenigen, welche nach 30 Minuten aus Lösung 3 herausgenommen waren, hatten viele schwimmende Larven gebildet. Die Kontrolleier waren unentwickelt, ausgenommen, daß einige angefangen hatten sich zu teilen.

Während ein Verbleiben von 30 Minuten in einer Mischung von 1 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 99 ccm Seewasser genügt, um die Eier zu veranlassen sich parthenogenetisch zu entwickeln, bleibt ein Verweilen von 30 Stunden in einer Lösung von $\frac{1}{2}$ ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + $99\frac{1}{2}$ ccm Seewasser ohne irgend welche Wirkung. Das kann bedeuten, daß eine Minimalmenge von K oder KCl in die Eier in einer gewissen Minimalzeit oder plötz-

lich eindringen muß. Jedoch kann es auch eine andere Erklärung finden.

Neunzehnte Reihe. Kommt die Befruchtungskraft des KCl den K-Ionen oder den KCl-Molekülen zu? Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden in die folgenden Lösungen verteilt:

(1) 1 ccm $2\frac{1}{2}$ n KBr + 97 ccm Seewasser
(2) 2 „ $2\frac{1}{2}$ n KBr + 98 „ „
(3) 1 „ $2\frac{1}{2}$ n KNO_3 + 99 „ „
(4) 2 „ $2\frac{1}{2}$ n KNO_3 + 98 „ „
(5) 3 „ 1,2 n K_2SO_4 + 97 „ „
(6) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier blieben 30 Minuten lang in diesen Lösungen und wurden dann in normales Seewasser zurückgebracht. Die Eier, welche in die Lösungen 2, 4 und 5 gelegt worden waren, bildeten eine große Anzahl schwimmender Larven, die anderen blieben unentwickelt. Dies Experiment beweist, daß die K-Ionen und nicht die KCl-Moleküle die parthenogenetische Entwicklung der Chaetopteruseier erzeugen.

Schlußfolgerungen. Diese Experimente bestätigen den oben gezogenen Schluß, daß die unbefruchteten Eier des Chaetopterus sich nicht zu Trochophoren entwickeln können, wenn sie in normalem Seewasser gelassen werden. Eine kleine Anzahl K-Ionen ist jedoch imstande sie zu parthenogenetischer Entwicklung zu veranlassen. Wenn die Eier drei

Minuten lang in eine Mischung von 2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 98 ccm Seewasser gelegt werden, können sie sich parthenogenetisch entwickeln. Wenn das Seewasser weniger K-Ionen enthält, d. h. wenn wir nur 1 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl auf 99 ccm Seewasser hinzufügen, müssen die Eier länger in der Lösung bleiben. Schließlich wenn wir nur $\frac{1}{2}$ ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl auf $99\frac{1}{2}$ ccm Seewasser zusetzen, sind die Eier nicht imstande sich parthenogenetisch zu entwickeln, gleichgültig, wie lange sie in einer solchen Lösung gelassen werden. Sie können durch eine reine KCl-Lösung von beträchtlich niedrigerem osmotischen Druck als der des Seewassers veranlaßt werden die Trochophorenstufe zu erreichen. Würde das Seewasser nur eine um weniges größere Menge von K enthalten, so könnten wir finden, daß Chaetopterus normal parthenogenetisch wäre.

IV. Künstliche Parthenogenese durch einen geringen Zusatz von HCl zum Seewasser erzeugt.

In meinen Experimenten über Echinodermen hatte ich gefunden, daß der Zusatz einer kleinen Menge von Säure oder Alkali die unbefruchteten Eier der Seeigel veranlaßt sich viel schneller zu furchen, als dies im normalen Seewasser der Fall ist. Ich beabsichtigte die Wirkungen derselben Agentien auf die Eier des Chaetopterus zu versuchen. Das Seewasser

ist leicht alkalisch, d. h. es besitzt eine kleine Menge freier Hydroxyl-Ionen in Lösung[1]). Wenn wir mehr Alkali hinzufügen, wird die Zahl der Hydroxyl-Ionen nur wenig vermehrt, da sich ein Niederschlag von $Mg(HO)_2$ bildet. Mit Säuren ist es anders. Wenn wir eine gewisse kleine Menge zusetzen, wird das Seewasser neutral; und wenn wir mehr zusetzen, wird es sauer entsprechend der Menge und dem Grad der Dissociation der gebrauchten Säure. Alles Seewasser bei diesen Experimenten wurde sterilisiert.

Zwanzigste Reihe. Die folgenden Lösungen wurden gebraucht.

(1) 100 ccm Seewasser + 2 ccm $\frac{1}{10}$ n NaHO
(2) 100 „ „ + 2 „ $\frac{1}{10}$ n KHO
(3) 96 „ „ + 4 „ $\frac{1}{4}$ n Na_2CO_3
(4) 100 „ „ + 2 „ $\frac{1}{10}$ n HCl
(5) 100 „ „ + 3 „ $\frac{1}{10}$ n HCl
(6) normales Seewasser (Kontrolle).

Die Eier eines Weibchens wurden in diese Lösungen verteilt. Eine Portion der Eier wurde aus diesen Lösungen herausgenommen und in normales Seewasser zurückgebracht; die anderen blieben dauernd in diesen Lösungen. 24 Stunden später waren die Resultate wie folgt: Von den Eiern, welche 24 Stunden in den Lösungen geblieben waren, hatten jene in den

[1]) Dies ist richtig für das Seewasser in Woods Hole, aber nicht für das Seewasser in Californien (1906).

Lösungen 2 und 4 gut entwickelte Trochophoren gebildet, welche umherschwammen. In Lösung 1 schienen sich mehrere Eier entwickelt zu haben, aber ich war nicht imstande eine schwimmende, oder eine wimperntragende Larve zu finden. Die Eier in den anderen Lösungen waren unentwickelt. Die Eier, welche in den Lösungen 2 und 3 nur 5—10 Minuten gewesen waren, zeigten einige Trochophoren, die anderen waren unentwickelt.

Es ist augenscheinlich, daß KHO wirksamer ist, als NaHO und es ist auch verständlich, daß die Wirkung der K-Ionen die Wirkung der HO-Ionen vermehrt haben könnte. Die Tatsache, daß der Zusatz einer kleinen Menge von HCl zum Seewasser die parthenogenetische Entwicklung der Chaetopteruseier verursacht, ist in den vorliegenden Experimenten auffallend und überzeugend.

Einundzwanzigste Reihe. Die unbefruchteten Eier eines Chaetopterus wurden in folgenden Lösungen verteilt:

(1) 100 ccm Seewasser + 1 ccm $\frac{1}{10}$ n HCl
(2) 100 „ „ + 2 „ $\frac{1}{10}$ n HCl
(3) 100 „ „ + 3 „ $\frac{1}{10}$ n HCl
(4) normales Seewasser (Kontrolle).

Eine Portion der Eier blieb in diesen Lösungen fünf Minuten lang, die anderen dauernd. Die Eier, welche nach fünf Minuten aus den Lösungen ge-

nommen wurden, waren unentwickelt, mit Ausnahme einiger weniger, welche in Lösung 2 gewesen waren und die Trochophorenstufe erreichten. Die Eier, welche dauernd in den Lösungen 1 und 2 blieben, bildeten eine große Anzahl schwimmender Larven. Die Eier in den Lösungen 3 und 4 waren unentwickelt und tot.

Zweiundzwanzigste Reihe. Es war augenscheinlich, daß der Zusatz von 2 ccm $\frac{1}{10}$ n HCl auf 100 ccm Seewasser imstande war die Entwicklung der unbefruchteten Eier des Chaetopterus zu verursachen, besonders der Eier, welche dauernd in dieser Lösung blieben. Ich beabsichtigte nun zu sehen wie lange die Eier in solch einer Lösung bleiben müssen, um die Trochophorenstufe zu erreichen. Es wurden daher Eier in eine derartige Lösung gelegt und in Zwischenräumen von 10, 30, 60, 90 und 120 Minuten herausgenommen. Eine Portion blieb beständig darin. Eine große Anzahl schwimmender Larven entwickelten sich nur in der letzteren Portion; in den ersteren dagegen fanden sich keine. Die Kontrolleier blieben ganz und gar unentwickelt.

Obgleich diese Experimente noch nicht als beendet angesehen werden können, scheinen sie anzudeuten, daß in einer Lösung von 100 ccm Seewasser + 2 ccm $\frac{1}{10}$ n HCl die unbefruchteten Eier des Chaetopterus die Trochophorenstufe erreichen können.

V. Morphologische Beobachtungen über die Entwicklung der unbefruchteten Eier von Chaetopterus.

Ich habe mich bis jetzt auf die Darlegung beschränkt, daß gewisse Lösungen imstande sind die unbefruchteten Eier des Chaetopterus zu veranlassen die Trochophorenstufe zu erreichen und als Trochophoren umherzuschwimmen. Bis jetzt ist noch nichts über die Art der Entwicklung dieser parthenogenetischen Eier gesagt worden. Ich habe ihre Entwicklung sehr sorgfältig beobachtet und eine Anzahl von Camerazeichnungen gemacht. Dieser Teil der Arbeit ist wesentlich für Experimente über Parthenogenese. Wenn man durchaus gewiß in betreff des parthenogenetischen Charakters der Entwicklung zu sein wünscht, ist eine fortgesetzte genaue Beobachtung und das Studium der Eier während der ersten 7—9 Stunden notwendig. Während dieser Zeit stoßen die parthenogenetischen Eier ihre Polkörperchen aus, teilen sich und werden Trochophoren, während die Kontrolleier und die mit unwirksamen Lösungen behandelten Eier ganz kugelig und unverändert bleiben. Das Ei des Chaetopterus ist sehr dunkel und undurchsichtig, und es ist aus diesem Grunde schwieriger, die Zahl der Furchungszellen darin zu bestimmen als in dem Ei der meisten Echinodermen. Die befruchteten Eier des Chaetopterus entwickeln sich sehr schnell. Bei einer günstigen Temperatur entwickeln sich die Wimpern

fünf Stunden nach der Befruchtung und die Larven beginnen zu schwimmen. Die Entwicklung der unbefruchteten Eier unterscheidet sich in den meisten Fällen von der der befruchteten Eier. Sie ist ein wenig langsamer, und die Natur der Furchung und die Deutlichkeit der einzelnen Furchungskugeln variieren beträchtlich mit der Natur der Ionen, welche dem Seewasser zugesetzt werden oder dem Agens, welches angewendet wurde, um die künstliche Parthenogenese zu bewerkstelligen. Wenn K-Salze gebraucht werden, bemerkt man in der Regel nicht viel mehr von der beginnenden Furchung, als daß die Eier in ihrem Umriß unregelmäßig und amöboid werden. In den Experimenten mit Ca-Salzen und Säuren waren die Furchungskugeln viel deutlicher und regelmäßig. Fig. 6 gibt ein gutes, schematisches Bild von dem amöboiden Charakter der K-Eier. Bei dem Experiment, bei welchem diese Eier gezeichnet wurden, waren die unbefruchteten Eier eines Chaetopterus in eine Mischung von 98 ccm Seewasser und 2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl um 9 Uhr 43 Minuten gelegt worden. Sie blieben 40 Minuten in dieser Lösung und wurden

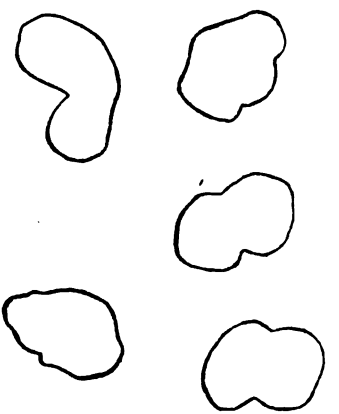


Fig. 6.

dann in normales Seewasser zurückgebracht. Dre Stunden später, um 1 Uhr 40 Minuten wurde di Zeichnung Fig. 6 gemacht. Es ist unmöglich, in diese Eiern irgend welche deutlichen Furchungskugeln z erkennen. Alles was man sagen kann, ist, daß si ihren kugeligen Umriß verloren haben und amöboi sind. Ich habe niemals etwas ähnliches bei befruch teten Eiern oder bei unbefruchteten Eiern, die i normalem Seewasser gelassen waren, gesehen. Wen die letzteren sich überhaupt teilen, beginnen sie da mit erst nach 7—9 Stunden und bilden dann deutlich Furchungszellen.

Das Aussehen der Eier und die Form der Fur chung sind solcher Art deutlich eine Funktion de Beschaffenheit des Seewassers. Da die K-Eier Trocho phoren, welche ebenso normal aussehen, wie jene, di sich aus unbefruchteten Eiern entwickeln, bilden könner so ist es klar, daß das Aussehen der Furchungszelle von sehr geringer Bedeutung in der Bildung de Embryo ist. Der Unterschied zwischen der Entwick lung der unbefruchteten K-Eier und befruchteter Eie kann aus Fig. 7 ersehen werden. Bei den Experi menten, in denen diese Zeichnungen gewonnen wur den, waren die Eier eines Weibchens in zwei Portione geteilt. Die eine wurde 11 Uhr 45 Minuten durc den Zusatz von Samen befruchtet, die andere wurd zu derselben Zeit 45 Minuten lang in eine Mischun von 98 ccm Seewasser + 2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl geleg

15—20 Minuten, nachdem die Eier in diese Mischung gelegt waren, stießen sie ihre Polkörperchen aus; bisweilen war eins, manchmal waren zwei sichtbar. Das stimmt mit Meads Beobachtungen überein. In den unbefruchteten Kontrolleiern, welche in normalem Seewasser geblieben waren, wurde nichts derartiges bemerkt.

Nachdem die Eier 55 Minuten in der KCl-Mischung zugebracht hatten, wurden sie in normales (sterilisiertes) Seewasser zurückgebracht. In 10—30 Minuten begannen sie ihre kugelige Form zu verlieren, und in einigen Eiern erschienen kleine Fortsätze oder Knospen, die entweder blieben oder wieder zurückgezogen wurden. Die Eier glichen in ihrem Verhalten Amöben. In Fig. 7 ist auf der linken Seite die Entwicklung der befruchteten Portion dargestellt, auf der rechten Seite die der unbefruchteten Eier. Ungefähr um dieselbe Zeit wurde eine Zeichnung der befruchteten und unbefruchteten K-Eier gemacht. Um 12 Uhr 45 Minuten wurden einige der befruchteten Eier in dem vier- oder achtzelligen Stadium gefunden. Die unbefruchteten Eier waren zu derselben Zeit nur amöboid. Einige von ihnen (s. Fig. 7) zeigten um 12 Uhr 55 Minuten einen Einschnitt, als ob sie im Begriff wären, sich zu teilen. Um 1 Uhr 20 Minuten hatten einige der befruchteten Eier die 16zellige Stufe erreicht, dagegen wurden 1 Uhr 30 Minuten nur weniger Eier unter den K-Eiern gefunden, die geteilt zu sein schienen. Um

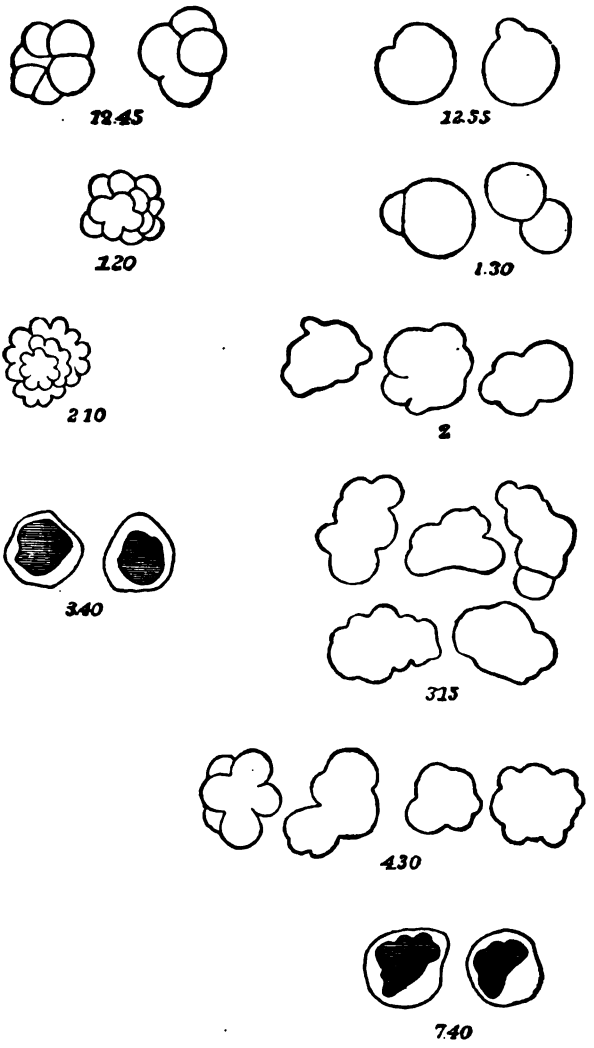


Fig. 7.

2 Uhr 10 Minuten waren die befruchteten Eier in einem vorgerückten Stadium der Zellteilung, während die K-Eier nicht deutlich geteilt waren. Um 3 Uhr 40 Minuten hatten die befruchteten Eier das Trochophorenstadium erreicht, sie zeigten helle Außenschicht und dunkles Zentrum. Um diese Zeit zeigten die am meisten differenzierten Eier der parthenogenetischen Portion ein Aussehen, welches in Fig. 7 (3 Uhr 15 Minuten) dargestellt ist. 4 Uhr 30 Minuten finden wir diese Eier noch in derselben Verfassung, und nicht vor 7 Uhr 40 Minuten erreichten die parthenogenetischen Eier den Anfang der Trochophorenstufe — hellen Rand und dunkles Zentrum (Fig. 7). Die befruchteten Eier hatten ihre Flimmerhaut gebildet und um 5 Uhr schwammen sie umher, während die K-Eier nicht vor 8 oder 9 Uhr anfingen zu schwimmen. Die unbefruchteten Kontrolleier, welche während dieser Zeit in normalem Seewasser geblieben waren, waren um 8 Uhr noch ganz und gar kugelig und zeigten keine Spur von Entwicklung oder Veränderung.

Die Zeichnungen in Fig. 7 geben eine Vorstellung von der Entwicklung der parthenogenetischen Eier. Zur Ergänzung diene die Angabe, daß nicht alle Eier sich so verhielten wie die gezeichneten. Die Mehrzahl der parthenogenetischen Eier zeigte niemals einen höheren Grad von Differenzierung während der Entwicklung, als die in Fig. 6 gezeichneten; viele Eier blieben sogar kugelig. Die Zahl der Trochophoren

war immer beträchtlich größer, als die Zahl der Eier, welche amöboid wurden. Die Mehrzahl der parthenogenetischen Trochophoren ist vollkommen kugelig. Ich habe mich oft verwundert gefragt, wie es für die unbefruchteten K-Eier möglich wäre, das Trochophorenstadium, ohne irgend ein sichtbares äußeres Zeichen der Furchung[1]), zu erreichen. Ich muß eine entscheidende Antwort auf die Frage bis nächstes Jahr verschieben.

Ein anderer Punkt, welcher erwähnenswert ist, ist die Tatsache, daß die Erscheinung der Furchung bei dieser Form umkehrbar zu sein scheint, insofern, als ein Ei sich in zwei Furchungskugeln teilt, welche sehr bald wieder zusammenschmelzen. Solche Veränderungen, welche sehr plötzlich stattfinden, können gelegentlich bei unbefruchteten Eiern von Chaetopterus gesehen werden. Fig. 8 zeigt die aufeinander folgenden Stufen, welche an einem Ei innerhalb vier Minuten beobachtet wurden. Ich hatte diese auffallenden Veränderungen mehrere Minuten lang beobachtet, ehe ich mich entschloß sie zu zeichnen. Das Ei war eine Stunde lang in einer Mischung von 95 ccm Seewasser + 5 ccm 2½ n NaCl gewesen und war seit 8 Stunden wieder in dem Seewasser. Als ich anfing das Ei zu zeichnen, hatte es das Aussehen als ob es im zweizelligen Stadium sei (Fig. 8, 8.04).

[1]) Prof. F. Lillie bestätigte im folgenden Jahr diese Vermutung. (1903.)

Zehn Sekunden später veränderte es sich plötzlich in ein dreizelliges Stadium, indem die obere Kugel sich in zwei Zellen teilte (Fig. 8, 8.04½) Einige Sekunden danach begann die untere Kugel in die rechte obere hineinzufließen, 8.05 und 8.05½ war sie vollständig verschwunden. Das Ei war wieder in dem

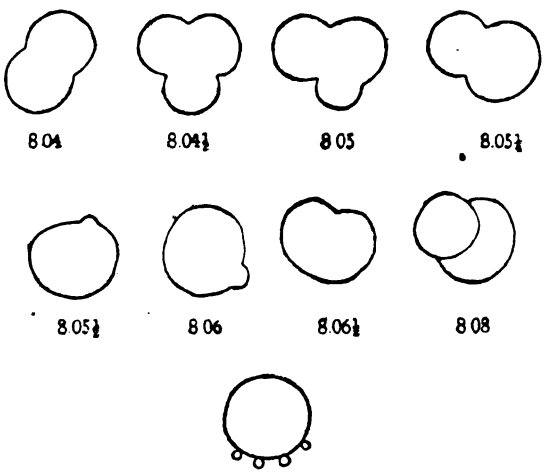


Fig. 8.

zweistelligen Stadium (8.05¼). Dann verschmolzen die zwei Kugeln und eine kleine Kugel oder ein Tröpfchen erschien darüber. Dies verschwand beinahe sogleich wieder, und ein neues Tröpfchen machte sich an der rechten unteren Seite des Eies los (8.06). Es verschwand in wenigen Sekunden und das Ei teilte sich noch einmal, aber bei einer ganz verschiedenen Lage der Furchungsebene (8.06½, 8.07½). In

wenigen Sekunden verschmolzen die beiden Kugel in eine Zelle und eine Anzahl kleinere Tröpfchen e schien unten (8.08). Natürlich ist es unmöglich, z sagen, ob diese einzelnen Kugeln oder Tröpfchen Kern enthielten. Diese Erscheinungen sind wichtig, insofer sie zeigen, daß die Hauptmasse des Eies flüssig ist, un daß bei Chaetopterus wenigstens die Viskosität sel gering ist, geringer als bei dem Ei des Seeigels. E ist schwer verständlich, was für eine Art Struktur einer flüssigen Masse von solch niedrigem Grade d Viskosität über die Differenzierung in Kern- un Protoplasmamaterial und möglicherweise Centrosome hinaus vorgebildet sein könnte."

Das Aussehen der Trochophoren, die von unbe fruchteten Eiern herrühren, ist genau so, wie da von denjenigen, die von befruchteten Eiern stamme wenn man die gleichen Stufen der Entwicklun vergleicht. Fig. 7 gibt keine gute Vorstellung d

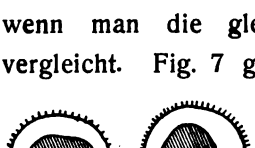


Fig. 9.

Trochophore, insofern, als dies zuerst kugelig ist. Fig. 9 zei zwei mit der Camera, abgesehe von den Wimpern, aufgenom mene parthenogenetische Tro chophoren, welche mehr oder weniger diagrammatisc sind. Die Eier, aus denen diese Trochophoren en sprangen, waren mit KCl behandelt worden. E braucht kaum erwähnt zu werden, daß das Aussehe der Trochophoren, welche sich aus parthenogenetische

Eiern entwickeln sehr von der Behandlung, die das Ei erfahren hat, abhängt. Ich erwähnte das bereits in Verbindung mit der künstlichen Parthenogenese der Seeigel.

Ein Punkt, welcher erörtert werden muß, ist die Lebensdauer der Trochophoren. Alle Chaetopterus-larven, sowohl jene aus befruchteten Eiern, als auch die aus unbefruchteten Eiern entwickelten, starben nach zwei Tagen. Da die befruchteten Eier sich schneller entwickelten, als die unbefruchteten, waren die aus ersteren Eiern entwickelten Trochophoren zur Zeit des Todes in einem vorgerückteren Stadium als die parthenogenetischen Trochophoren. Nach der Energie ihrer Bewegung zu urteilen, kommt die Lebenskraft der parthenogenetischen Trochophoren derjenigen der aus befruchteten Eiern herrührenden Trochophoren gleich[1]). Die Ursache des Todes war augenscheinlich die Entwicklung von Mikro-organismen in den schlecht durchlüfteten Kultur-schalen. Die parthenogenetischen Larven von Ar-bacia lebten unter ähnlichen ungünstigen Umständen 10 Tage lang.

---

[1]) Im folgenden Jahr fand ich, daß die Lebenskraft dieser parthenogenetischen Larven beträchtlich geringer ist, als die der Larven, welche von befruchteten Eiern stammten (1903).

VI. Über die Wirkung verschiedener Ionen auf die künstliche Erzeugung von parthenogetischen Riesen- und Zwergembryonen bei Arbacia und Chaetopterus.

In einer früheren Arbeit über künstliche Parthenogenese der Seeigel habe ich die Tatsache erwähnt, daß in der Regel mehr als ein Embryo aus einem Ei entspringt[1]). Es war nichts ungewöhnliches, drei, vier oder sogar sechs Blastulae aus einem Ei hervorgehen zu sehen. Natürlich war jeder dieser Embryonen kleiner als ein normaler Embryo von Arbacia, bei welchem die ganze Masse für einen Embryo benutzt wird. Bei meinen ersten Experimenten hatte ich die parthenogenetische Entwicklung der Eier von Arbacia durch Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers mittels Zusatz von $MgCl_2$ verursacht. Seitdem habe ich gefunden, daß es von der Natur der Substanz, welche dem Seewasser zugesetzt wird, abhängt, ob die parthenogenetischen Larven Zwerge sind oder normale Größe haben. Wenn die unbefruchteten Eier von Arbacia in Seewasser gelegt werden, dessen osmotischer Druck durch den Zusatz von KCl (z. B. 88 ccm Seewasser + 12 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl) erhöht worden ist, entwickeln sie sich, wenn sie nach zwei Stunden in normales Seewasser zurückgebracht werden, zu schwimmenden Larven. In diesem Falle

[1]) Stud. in gen. Phys. Teil II, S. 576.

entwickelt sich in der Regel nur ein Embryo aus einem Ei, Zwerglarven sind eine Ausnahme. Wenn jedoch anstatt des KCl die entsprechende Menge von NaCl oder $MgCl_2$ dem Seewasser zugesetzt wird, entspringt in der Regel mehr als ein Embryo aus einem Ei, und Larven von normaler Größe sind selten. Ich habe nicht viele Experimente mit $CaCl_2$ gemacht, aber es scheint dieses mehr wie KCl als wie NaCl zu wirken. Bei den Experimenten, bei welchen der osmotische Druck des Seewassers durch Rohrzucker erhöht wurde, wurden ebenfalls Zwergblastulae beobachtet.

Ich habe schon in einer früheren Arbeit erwähnt, daß der Mangel einer Membran das Entspringen von mehr als einem Embryo aus dem unbefruchteten Ei begünstigt. Das befruchtete Ei hat eine Membran, welche die Furchungszellen zusammenhält. Aber wenn die Membran zerstört wird, kann das Ei mehr als einen Embryo erzeugen. In einer kleinen Anzahl unbefruchteter Eier erzeugt die Behandlung mit KCl ein sehr dünnes Häutchen, welches als eine Membran wirken kann und die Furchungszellen daran verhindert, sich zu trennen. Aber solch ein feines Häutchen fehlt bei der Mehrzahl der Eier, welche mit KCl (oder $CaCl_2$) in den richtigen Verhältnissen behandelt werden, um Parthenogenese zu erzeugen. Dennoch sehen wir nicht das Auseinanderfallen der Furchungszellen, welches in dem Falle der NaCl- oder $MgCl_2$-Eier zu der Bildung von mehr als einem Embryo aus

unbefruchteten Eiern eines Seeigels führt. Die B
obachtung des Furchungsprozesses zeigt, daß die B
handlung der Eier mit KCl die Adhäsionskraft d
Furchungszellen aneinander vermehrt. Die verschi
denen Furchungszellen eines K-Eies kleben zusamme
während nach einer Behandlnng mit NaCl die Fu
chungszellen viel weniger zusammenhängen und ze
fallen. Dieselbe Neigung wird durch den Zusa
von $MgCl_2$ zum Seewasser erzeugt. Es ist ganz g
möglich, daß die relative Menge der verschieden
Ionen den Grad des Zusammenhangs in den Furchung
zellen beeinflußt. Herbst hat beobachtet, daß im Se
wasser ohne Ca die Furchungszellen der befruchtet
Eier ein Streben zum Auseinanderfallen zeigen[1]).

Es war zu erwarten, daß wenn KCl die Zellen de
selben Eies zum Zusammenkleben veranlaßt, es au
mehrere Eier zu einer Agglutination veranlassen könn
Wir wissen aus den Experimenten von Driesch[2]) u
Morgan[3]) über die Eier der Seeigel und von Z
Strassen[4]) über die Eier von Ascaris, daß, wenn zw
Eier zusammenkleben, sie einen einzigen Embryo v
größerem Umfange erzeugen können. Ich habe ni
mals Riesenembryonen in den parthenogenetischen Eie
der Seeigel beobachtet. Aber ich habe sie beina

[1]) Herbst, Archiv für Entwicklungmechanik, Bd. IX (190
S. 424.

[2]) Driesch, ibid., Bd. X (1900), S. 411.

[3]) Morgan, ibid., Bd. II (1895), S. 65.

[4]) Zur-Strassen, ibid., Bd. VII (1898), S. 642.

bei jedem Experiment, in welchem die Chaetopteruseier mit Kalium behandelt worden waren, gesehen. In solchen Fällen sah man zwei oder mehrere Eier zusammenkleben, und das Resultat war entweder, daß zwei oder mehrere Trochophoren zusammenwuchsen oder ein einzelner Riesenembryo entstand, der zwei bis dreimal so groß war, wie eine normale Trochophore. Natürlich gab es zwischen beiden Extremen alle Arten von Übergängen. Die Bildung eines Riesenembryo durch das Verschmelzen von zwei oder drei Eiern ist um so bemerkenswerter, da die Chaetopteruseier sogar in unbefruchtetem Zustande eine Membran besitzen. Diese Membran wird augenscheinlich an dem Berührungspunkte von zwei Eiern verflüssigt. Diese durch K verursachte Verbindung ist nicht nur bei unbefruchteten sondern auch bei befruchteten Eiern des Chaetopterus bemerkbar. Fig. 10 zeigt eine Anzahl von Trochophoren, welche aus zusammengeballten befruchteten Eiern von Chaetopterus entsprangen. Alle diese und viele anderen Exemplare dieser Art wurden in wenigen, mit einer Pipette herausgenommenen, Tropfen der Kultur gefunden. Ich habe versucht Camerazeichnungen der verschiedenen Typen, welche vorkamen, anzufertigen. Die Embryonen waren acht Stunden alt und begannen sich zu bewegen. Nr. 1 (Fig. 10) ist eine aus einem Ei entwickelte Trochophore; Nr. 2 zeigt zwei Trochophoren, welche zusammengewachsen, aber sonst unabhängig sind. In

Nr. 3 bemerken wir den Anfang einer gewöhnlichen Organisation, insofern als die hellen peripherischen Flächen (auf der rechten Seite) zusammengeschmolzen sind. In Nr. 4, 5 und 6 sind die hellen Flächen bei-

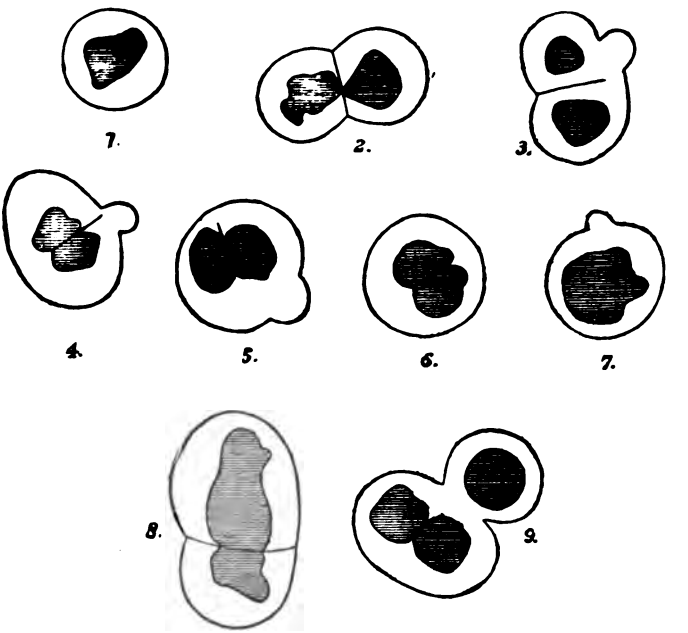


Fig. 10.

nahe vollständig miteinander verschmolzen und nur die dunklen Mittelstücke bleiben getrennt. In Nr. 7 sind beide Eier vollständig miteinander verschmolzen und bilden einen Riesenembryo mit einem einheitlichen Komplex von Organen. Fälle, ähnlich wie dieser, sind sehr häufig bei dem mit KCl behandelten

Material. Nr. 8 und 9 sind Beispiele der Verschmelzung von mehr als zwei Eiern. Ich habe vier Eier einen Riesenembryo mit einem gewöhnlichen dunklen Mittelstück und einem gewöhnlichen hellen Feld, sich bilden sehen. Solche Mißbildungen schwammen, aber starben gewöhnlich eher, als die Einzelembryonen.

Die Tatsache, daß die Verschmelzung von zwei Eiern in einem Riesenembryo häufiger bei Chaetopterus als bei Arbacia vorkommt, kann durch die Verschiedenheit in der Viskosität dieser beiden Eierarten veranlaßt werden.

Die Bildung eines Riesenembryo aus zwei Eiern ist so sehr interessant, weil das Chaetopterusei eine charakteristische Zellfolge besitzt. Wir müssen hieraus schließen, daß die Zellfolge entweder ein untergeordnetes Element in der Bildung des Embryo ist, oder daß die früheren Prozesse der Differenzierung in dem Chaetopterusei teilweise oder ganz umkehrbar werden (siehe Abteilung X).

Ich habe sehr wenige Experimente mit $CaCl_2$ gemacht, aber in diesen wurden Riesenembryonen gebildet. Eier, welche eine Stunde lang in einer Lösung von 90 ccm Seewasser + 10 ccm 5 n $CaCl_2$ gewesen waren, erzeugten eine Anzahl Riesenembryonen. Ein sicherer Weg, um Riesenembryonen bei Chaetopterus zu erhalten, ist, daß man die unbefruchteten Eier ungefähr eine Stunde lang in eine Mischung von 97 ccm Seewasser und 3 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl legt.

Ich habe zuweilen, aber sehr selten, gefunden, daß die befruchteten Eier des Chaetopterus Zusammenballen in normalem Seewasser zeigen. Dieselbe Erscheinung scheint bei den Eiern von Ascaris gemäß Zur Strassen[1]) vorzukommen.

Zwergembryonen werden selten bei Chaetopterus getroffen. Ich habe sie bei den Experimenten mit HCl gefunden. Vielleicht verhindert die Existenz einer Membran die unbefruchteten Eier des Chaetopterus Zwergembryonen eben so leicht zu bilden, wie die unbefruchteten Eier der Seeigel es tun.

VII. Über den Unterschied zwischen der künstlichen Parthenogenese der Echinodermen und Chaetopterus und der Möglichkeit einer Kreuzung zwischen den beiden.

Es ist unmöglich Arbacia und Chaetopterus in normalem Seewasser zu kreuzen. Ich habe eine Anzahl von Experimenten versucht, aber mit negativem Resultat, wie zu erwarten war. Das negative Resultat kann dadurch veranlaßt werden, daß es dem Spermatozoen der einen Art unmöglich ist in das Ei der anderen Art einzudringen oder durch die Tatsache, daß das Spermatozoon des Chaetopterus die Entwicklung des Chaetopteruseies durch Substanzen bewirkt, welche bei dem Arbaciaei unwirksam sind, und

[1]) Zur-Strassen, loc. cit.

umgekehrt; oder das Spermatozoon der einen Art ist für das Ei der anderen giftig oder umgekehrt [1]). Die zweite Möglichkeit ist von Interesse für uns, weil wir die parthenogenetische Entwicklung der Chaetopteruseier durch Mittel herbeiführen können, die keine Wirkung auf das Arbaciaei haben.

Wenn wir die Absicht haben, künstliche Parthenogenese bei den Eiern der Echinodermen zu erzeugen, ist es nur nötig sie $1^1/_2$—2 Stunden in Seewasser zu legen, dessen osmotischer Druck um $37^1/_2$—75% erhöht worden ist, das heißt in Seewasser, dem $12^1/_2$ bis 25% seines Volumens einer $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung oder einer Lösung, welche isosmotisch mit der letzteren ist, zugesetzt worden sind. Wir haben den osmotischen Druck des Seewassers in Woods Hole noch nicht bestimmt und nehmen auf indirekte Angaben hin an, daß es ungefähr isosmotisch mit einer $\frac{5}{3}$ n NaCl-Lösung ist. Die günstigste Vermehrung des osmotischen Druckes variiert für verschiedene Arten und sogar für verschiedene Weibchen derselben Art. — Es kann sein, daß die Temperatur des Wassers und der Reifegrad der Eier eine Rolle spielen. Wenn man Experimente dieser Art macht, ist es nötig, immer eine Reihe von Lösungen von verschiedenem osmotischen Druck zu gebrauchen und die Eier in verschie-

[1]) Gewisse Bestandteile des Blutes (Globuline, Enzyme?) zerstören häufig die Blutkörperchen anderer Arten, welche nicht nahe verwandt sind.

denen Zwischenräumen nach $1^1/_2$—2 Stunden oder länger, herauszunehmen, bis die günstigste Konzentration und Zeit bestimmt worden ist.

Eine Vermehrung des osmotischen Druckes des Seewassers ist auch imstande künstliche Parthenogenese bei Chaetopterus zu verursachen. Der Hauptunterschied zwischen Chaetopterus- und Arbaciaeiern ist, daß die Chaetopteruseier bei derselben Temperatur nicht so lange in der konzentrierten Lösung zu bleiben brauchen, wie die Arbaciaeier.

Obgleich in dieser Hinsicht der Unterschied zwischen Chaetopterus und Arbacia gering ist, existiert ein sehr auffallender Unterschied in bezug auf die spezifischen Wirkungen der K-Ionen auf die Entwicklung. Während eine reine KCl-Lösung von niedrigerem Druck als Seewasser, oder Seewasser mit einer geringen Vermehrung des K, z. B. eine Mischung von 98 ccm Seewasser + 2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl die parthenogenetische Entwicklung der Eier des Chaetopterus verursacht, nachdem dieselben nur wenige Minuten einer solchen Lösung ausgesetzt waren, sind solche Lösungen ohne irgend welche Wirkung auf die unbefruchteten Eier der Seeigel (Arbacia). Ich ließ die unbefruchteten Eier von Arbacia wiederholt in einer Mischung von 98 ccm Seewasser + 2 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl oder 97 ccm Seewasser + 3 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl drei Minuten bis 24 Stunden lang, ohne daß irgend eine Entwicklung erfolgte, mit Ausnahme von einigen Eiern, welche nach 20 Stun-

den das zweizellige Stadium erreichten. Aber dies kommt gerade so gut in normalem Seewasser vor.

Was die Arbaciaeier anbetrifft, kann ich nur angeben, daß, wenn wir den osmotischen Druck des Seewassers durch einen Zusatz von KCl vermehren, es einer um weniges geringeren Vermehrung des osmotischen Druckes bedarf, um die parthenogenetische Entwicklung auszuführen, als wenn wir NaCl zusetzen. Ich fand regelmäßig, daß während 90 ccm Seewasser + 10 ccm 2½ n KCl genügte, um viele Eier zu veranlassen die Blastulastufe zu erreichen, eine Mischung von 90 ccm Seewasser + 10 ccm 2½ n NaCl unwirksam war. Ich mußte 87½ ccm Seewasser + 12½ ccm 2½ n NaCl nehmen. Es ist jedoch möglich, daß dieser Unterschied nur scheinbar ist. Da Seewasser hauptsächlich aus NaCl besteht, wird der Zusatz von 10 ccm einer 2½ n KCl-Lösung auf 90 ccm Seewasser den osmotischen Druck des Seewassers weniger vermehren, als der Zusatz von 10 ccm einer 2½ n KCl-Lösung, da der Grad der Dissoziation geringer ist, wenn die Konzentration höher ist. Weitere Experimente mit reinen NaCl- und KCl-Lösungen werden darüber entscheiden, ob der Unterschied in dem Grade der Dissoziation für das Resultat verantwortlich ist. Ein zweiter typischer Unterschied zwischen dem Arbacia- und Chaetopterusei besteht darin, daß das letztere durch einen kleinen Zusatz von HCl zum Seewasser zur Entwicklung veranlaßt werden

kann. Irgend eine andere unorganische Säure würde wahrscheinlich gerade so wirken, da der Zusatz einer kleinen Menge von Cl-Ionen keine solche Wirkung hat. Dieser kleine Zusatz von Säure vermindert oder neutralisiert die Alkalinität des Seewassers, aber ich habe versäumt zu prüfen, ob das letztere dadurch sauer gemacht wird.

Dieselbe Behandlung veranlaßt die Arbaciaeier nicht sich über das zwei- oder vierzellige Stadium zu entwickeln, selbst wenn sie 24 Stunden in der Lösung gelassen werden. Ich habe diesen Sommer eine Anzahl neuer Experimente gemacht, aber ich konnte nur die in einer früheren Arbeit erwähnten Experimente bestätigen [1]).

Ich habe darauf hingewiesen, daß die Experimente über künstliche Parthenogenese uns zu der Annahme zwingen, daß der Einfluß des Spermatozoon auf die Entwicklung und die Übertragung der männlichen Eigenschaften von verschiedenen Bestandteilen des Spermatozoon abhängt. Auf der Basis dieser Annahme könnte die Möglichkeit einer erfolgreichen Bastardierung zwischen Tieren, die so weit voneinander entfernt sind, wie Würmer und Echinodermen, in Betracht gezogen werden. Wenn wir das Ei von Chaetopterus veranlassen könnten sich durch die Behandlung mit KCl zu entwickeln und zu gleicher Zeit das Spermatozoon einer Arbacia (oder eines gleich-

[1]) Studies in gen. Phys. Teil II, S. 576.

weit entfernten Tieres) zwingen könnten in das Ei einzudringen, so könnten wir Echinodermen-Eigenschaften in ein Annelidenei übertragen[1]). Aber in all meinen Versuchen in dieser Weise das Chaetopterusweibchen mit dem Arbaciamännchen zu kreuzen, erzielte ich nur vollkommene Trochophoren ohne Charakterzüge von Echinodermen. Obgleich das Problem in diesen zwei Formen nicht lösbar sein mag, glaube ich doch, daß die Experimente über künstliche Parthenogenese zuletzt Bastardierungen möglich machen werden, die auf andere Weise unmöglich sein würden. Ich beabsichtige diese Experimente fortzusetzen.

VIII. Vorläufige Experimente über Phascolosoma, Fundulus, Gonionemus und Podarke.

Ich will einen kurzen Bericht über Experimente geben, welche ich teilweise aus Mangel an Material und teilweise aus Mangel an Zeit nicht vollenden konnte. Meine Experimente über Phascolosoma wurden weitergeführt, als die übrigen. Ich fing damit an die unbefruchteten Eier dieser Art in Mischungen von 90 ccm Seewasser + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl zu legen und sie in dieser Lösung 30—150 Minuten zu lassen. Ich sah niemals, daß ein Ei das zweizellige Stadium erreichte. Dann wurden stärkere Lösungen versucht und

[1]) Vorausgesetzt, daß das Spermatozoon der Echinodermen kein Gift für das Annelidenei enthält.

jetzt fingen einige der Eier an sich zu teilen. Als die Eier 30 Minuten lang in eine Mischung von ungefähr 30 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl + 70 ccm Seewasser gelegt wurden, erreichten sie ein 30—60zelliges Stadium. Das Aussehen der Eier war so gut, daß möglicherweise bei einer Fortsetzung dieser Experimente parthenogenetische Larven erzeugt werden könnten. Bei diesen Experimenten empfing ich wertvolle Förderung von Dr. Gerould von Dartmouth College, welcher mit der Biologie und Embryologie dieser Form durchaus vertraut ist.

Bei Fundulus, einem Teleostier hatte ich insofern Erfolg, als ich die unbefruchteten Eier veranlaßte das zweizellige Stadium zu erreichen. Aber Mangel an Material verhinderte die Weiterführung der Experimente.

Bei meinen Experimenten über Gonionemus, einer Meduse erfreute ich mich der Hilfe von Dr. Murbach, welcher so gütig war, die Weibchen für mich auszusuchen. Dr. Murbach hatte beobachtet, daß man diese Tiere im Dunkeln zu jeder Zeit veranlassen kann Eier zu legen.

Meine Versuche (vier Experimente) künstliche Parthenogenese bei diesen Eiern zu erzeugen, mißlangen. Alles, was ich erreichen konnte war, daß ich die Eier zwang amöboid zu werden und umherzukriechen, aber es fand keine Teilung statt.

Bei Podarke, einem Anneliden, gelang es mir bei unbefruchteten Eiern die erste Furchung zu erzeugen.

Ich unterbrach diese Experimente, um weitere Versuche über Chaetopterus, welche vielversprechender waren, anzustellen.

IX. Natürliche und künstliche Parthenogenese.

Bei einer bestimmten, obgleich sehr kleinen Anzahl von Tieren besitzt jedes Ei die Eigenschaft sich parthenogenetisch zu entwickeln. Beispiele dieser Art werden bei Bienen, geselligen Wespen, Bombyx, Psyche, Daphnia, Pflanzenläusen u. a. gefunden. Bei all diesen Tieren kann das Ei auch durch ein Spermatozoon befruchtet werden. Wie kommt es, daß bei diesen Formen das Ei, wenigstens unter gewissen Bedingungen fähig ist, sich parthenogenetisch zu entwickeln, obgleich Befruchtung stattfinden kann? Unsere Experimente zeigen, daß, wenn die Beschaffenheit des Seewassers nur ein wenig verschieden wäre, d. h. wenn es ein wenig mehr K enthielte, Chaetopterus zu der Liste normal-parthenogenetischer Tiere gerechnet werden müßte. Was ich in meinem vorläufigen Bericht erklärte, nämlich daß die Beschaffenheit des Seewassers viele oder gewisse Formen verhindert natürlich parthenogenetisch zu sein, ist sicherlich der Fall bei Chaetopterus. Indem wir diese Darlegung umkehren, können wir sagen, daß bei den natürlichen parthenogenetischen Tieren es der Beschaffenheit des Blutes (oder des Seewassers?) zukommen mag, daß das Ei sich ohne Befruchtung entwickeln kann.

Die Brücke zwischen der Erscheinung der natürlichen und künstlichen Parthenogenese wird durch jene Tiere gebildet, bei welchen physikalische Faktoren entscheiden, ob ihre Eier sich parthenogenetisch entwickeln oder nicht. Bei Pflanzenläusen ist Parthenogenese die Regel, so lange die Temperatur hoch genug ist, oder die Pflanze reichlich Wasser hat. Wenn wir die Temperatur niedriger machen, oder die Pflanze vertrocknen lassen, findet geschlechtliche Fortpflanzung statt. Das Austrocknen der Pflanzen verursacht einen Wasserverlust in den Geweben der Läuse. Der Faktor, Wasserverlust, ermöglicht die künstliche Parthenogenese von Echinodermen und Chaetopterus. Bei Pflanzenläusen ist die Wirkung von derselben Art, jedoch in entgegengesetzter Richtung.

Ich habe irgendwo die Erklärung gelesen, daß Artemia salina parthenogenetisch ist, während Branchipus es nicht ist. Branchipus ist eine Süßwasser-Crustacee, welche, in konzentrierten Salzlösungen (Salzseen) erzeugt, kleiner wird und andere Veränderungen erleidet. In diesem Falle wird das Tier Artemia genannt. Wenn Artemia parthenogenetisch ist, während Branchipus es nicht ist, würde dies bedeuten, daß die unbefruchteten Eier des Branchipus sich nicht in süßem Wasser entwickeln können, während sie dies in Lösungen von viel höherem osmotischen Druck zustande bringen. Dies würde mit unserer Beobachtung über die künstliche Parthenogenese

von Echinodermen und von Chaetopterus übereinstimmen.

Wie ich schon in einer früheren Arbeit erwähnt habe, erklärt O. Hertwig, daß die unbefruchteten Eier einer Anzahl von Seetieren, welche ihre Eier in Seewasser legen, anfangen sich nach einer Anzahl von Stunden zu entwickeln, jedoch ihre Entwicklung nicht über die ersten Furchungsstufen hinaus fortsetzen. Arbaciaeier erreichen das zweizellige Stadium ungefähr in 20 Stunden; das Ei des Chaetopterus kann 12—16 Zellen entwickeln. Nach Hertwig zeigen nicht nur die Eier der Anneliden und Echinodermen diese Eigentümlichkeit, sondern auch die Eier gewisser Crustaceen. In einer früheren Arbeit habe ich eine von Janosik gemachte Beobachtung erwähnt, nämlich daß in dem Eierstock von Säugetieren gelegentlich Eier im Prozeß der Zellteilung gefunden werden. Wir werden diese Tatsachen in einem der nächsten Aufsätze benutzen.

Zum Schluß möchte ich noch ein paar Worte in betreff der von Herrn Viguier in Afrika veröffentlichten Experimente sagen. Er behauptet, daß die Eier von Arbacia, Toxopneustes und anderer Seeigel natürlich parthenogenetisch sind[1]). Es würde weder mit meinen Experimenten noch mit meinen Ansichten im Widerspruch stehen, wenn seine Angabe richtig wäre,

[1]) Viguier, Comptes rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 2. Juli 1900.

denn in all meinen Arbeiten habe ich angenommen, daß diese und viele andere (wenn nicht alle) Eier das Streben haben sich parthenogenetisch zu entwickeln, und daß nur die Beschaffenheit des Seewassers (oder Blutes?) schuld ist, wenn sie es unter normalen Bedingungen nicht tun[1]). Es könnte sein, daß die Beschaffenheit des Seewassers in Algier verschieden von dem der übrigen Welt ist, und so den Eiern des Seeigels erlaubt, sich parthenogenetisch zu entwickeln. Die Experimente des Herrn Viguier sind jedoch nicht derart, um dies wahrscheinlich zu machen. Es sind nur wenige der Zahl nach, und er scheint die Möglichkeit der Verunreinigung seiner Eier durch Spermatozoen nicht ausgeschlossen zu haben. Er faßte bei demselben Experiment immer Männchen und Weibchen zu gleicher Zeit an und öffnete sie. Er erwähnt auch nicht, daß seine Hände und Instrumente sterilisiert wurden. Wenn Männchen und Weibchen in derselben Schale sich befinden ist immer Gefahr vorhanden, daß das Wasser voll von Spermatozoen ist, besonders wenn das Material frisch ist. Der Samen klebt an der Oberfläche der Weibchen und es ist ganz und gar unmöglich die Befruchtung der Eier zu vermeiden. Gewiß erwähnt Viguier eine Vorsichtsmaßregel, aber dieselbe zeigt, daß er nicht mit den Methoden der Sterilisation und Desinfektion vertraut ist. Er wusch die Weibchen in filtriertem

[1]) Stud. in gen. Phys. Teil II, S. 539.

Seewasser ab. Wie jedermann weiß, gehen die Spermatozoen durch Filtrierpapier und außerdem entfernt das Seewasser die Spermatozoen von der Oberfläche des Weibchens nicht, denn die letzteren kleben an festen Körpern, wie Dewitz bewiesen hat. Um diese Quelle der Infektion zu vermeiden, wusch ich die Oberfläche des Weibchens mehrere Minuten lang in destilliertem Wasser, oder unter einem mächtigen Strom von frischem Süßwasser, was die Spermatozoen tötet. In meinen früheren Abhandlungen habe ich eine Beschreibung der bei Experimenten über Parthenogenese notwendigen Vorsichtsmaßregeln gegeben. Diese waren keineswegs übertrieben, wenn man sich ganz vor der Verunreinigung zu hüten wünschte. Es gelang mir nicht einmal bei meinem ersten Chaetopterusexperiment (siehe S. 172) die Verunreinigung durch Spermatozoen auszuschließen, obgleich meine Vorsichtsmaßregeln denen von Viguier weit überlegen waren.

Eine andere überraschende Tatsache in Viguiers Arbeit ist, daß er nicht erwähnt, ob seine unbefruchteten Eier eine Membran hatten oder nicht. In meinen Untersuchungen über Arbacia habe ich den Mangel oder das Vorhandensein einer Membran als das wichtigste Merkmal angesehen, um zu entscheiden, ob die Entwicklung der Eier dem Eindringen eines Spermatozoon oder der osmotischen oder chemischen Behandlung, welcher sie unterzogen wurden, zuzuschreiben ist. Die befruchteten Eier bilden eine dicke Mem-

bran, während die unbefruchteten im allgemeinen keine Membran haben (wenn sie nicht lange Zeit mit gewissen Salzen in ungewöhnlich großen Mengen behandelt werden). Die Furchung des parthenogenetischen Eies, welches keine Membran hat, ist so radikal von der des befruchteten Eies in einer Membran verschieden, daß dies das Interesse oder die Überraschung eines jeden Morphologen erwecken muß. Diese Unterschiede sind am bemerkenswertesten während der ersten Stunden der Entwicklung. Sobald das Ei sich der Blastulastufe nähert, beginnt sehr oft die Membran sich zu zersetzen. Ich glaube nicht, daß irgend ein erfahrener Beobachter gewagt haben würde den Bericht, daß die unbefruchteten Eier der Arbacia die Pluteusstufe erreichten, zu veröffentlichen, ohne sich selbst überzeugt zu haben, daß die unbefruchteten Eier keine Membran hatten[1]).

Herr Viguier gibt an, daß er meine Experimente zu wiederholen versuchte, aber nicht imstande war, sie zu bestätigen. Dies überrascht mich nicht, da er meine Abhandlungen nicht gelesen hatte, und da er nicht einmal wußte, wie meine Lösungen präpariert worden waren.

Meine Experimente sind von folgenden Autoren wiederholt und bestätigt worden: Dr. C. Herst (Neapel),

---

[1]) Viguiers Arbeit ist von A. Giard kritisiert worden Comptes rendus de la Société de Biologie, Bd. 52 (1900) S. 761.

Prof. E. B. Wilson (Columbia University), Dr. Hans Winkler (Tübingen) und Dr. S. Prowaseck (Prag) und teilweise von Prof. A. Giard (Paris). Außerdem wurden sie im vorigen Sommer mit Erfolg von allen Mitgliedern der Abteilung für Physiologie und Embryologie zu Woods Hole wiederholt. In betreff der Angabe, daß die unbefruchteten Eier von Arbacia oder Strongylocentrotus imstande wären, sich in normalem Seewasser zu Pluteis zu entwickeln, kann ich sagen, daß dies sicherlich in Woods Hole in Kalifornien nicht der Fall ist (gemäß meinen sehr zahlreichen Beobachtungen), ebenso nicht in Beaufort, N. C. und in Neapel und in andern Orten am Mittelmeer, welche von kompetenten Experimentatoren besucht worden sind.

X. Das Verhältnis der künstlichen Parthenogenese zu der Theorie der Befruchtung und der Lebenserscheinung im allgemeinen.

Die allgemeine Ansicht in betreff der Rolle des Spermatozoons im Befruchtungsprozeß ist, daß es als ein Reizmittel wirkt und als solches die Entwicklung des Eies herbeiführt. Diese Angabe ist sicherlich für jene Eier unrichtig, bei welchen wir imstande waren künstliche Parthenogenese zu erzeugen. Denn diese Eier gleich vielen anderen, fangen an sich ohne jedes Spermatozoon zu teilen, wenn sie lange genug in normalem Seewasser gelassen werden. Der einzige Unterschied zwischen diesen und den befruchteten

Eiern ist, daß die ersteren anfangen sich viel sp
zu teilen und daß ihre Entwicklung in den er
Furchungsstufen (höchstens 2—16 Zellen) aufhört.
dem letzteren Umstand kann die Tatsache, daß
Ei stirbt, ehe es Zeit hat sich weiter zu entwic
schuld sein.

Wenn wir die Tatsache betrachten, daß die
unter „normalen" Bedingungen wenigstens einen
lungsanfang zeigen, so nimmt der Vorgang der
fruchtung ein anderes Aussehen an. Das Spermato
kann nicht länger als die Ursache oder als
Reizmittel für den Entwicklungsprozeß gelten,
dern nur als ein Agens, welches einen Prozeß,
ohne dasselbe — wenn auch viel langsame
zustande kommen kann, beschleunigt. S
stanzen, welche chemische oder physikalische Proz
die ohne sie stattfinden könnten, beschleunigen,
den Katalysatoren genannt (Ostwald). Gemäß di
Definition können wir annehmen, daß das Sper
tozoon eine katalytische Substanz in das
hineinträgt, welche den Prozeß, der ohne
nur viel langsamer, herbeigeführt würde,
schleunigt.

Durch diese Tatsachen und Begriffe nimmt
Erscheinung der künstlichen Parthenogenese ein
deres Aussehen an. Es würde falsch sein zu sa
daß die K-Ionen das Reizmittel sind, wel
den Entwicklungsprozeß verursacht. Sie wirken

als Katalysatoren, die einen Prozeß beschleunigen, der sonst zu langsam vorwärtsgehen würde. Der Wasserverlust von seiten der Eizelle muß eine ähnliche Wirkung haben, aber wohl weniger direkt. Es kann sein, daß der Wasserverlust die chemischen Prozesse im Ei in einer solchen Weise ändert, daß sie eine Substanz bilden, die katalytisch wirkt.

Ob die durch das Spermatozoon eingeführten katalytischen Substanzen mit jenen, die ich bei meinen Experimenten anwendete, identisch oder nicht identisch sind, kann ich nicht sagen. Ich halte es für wahrscheinlich, daß in dem Falle von Chaetopterus die natürliche Befruchtung nicht durch K-Ionen herbeigeführt wird, insofern als die normale Entwicklung nicht die Kennzeichen einer Behandlung der Eier mit K zeigt.

Ich habe eine Reihe von Experimenten mit verschiedenen Enzymen gemacht, um die Entwicklung der unbefruchteten Eier der Arbacia herbeizuführen, aber bis jetzt ohne Erfolg. Das einzige Enzym, welches das Ei überhaupt zur Furchung veranlaßte, war Papain. Aber ich bin nicht sicher, ob dies nicht einem zufälligen Bestandteil des Enzympräparats, das gebraucht wurde, zuzuschreiben ist. Die anderen Enzyme waren durchaus ohne Erfolg. Wenn wir das wirksame Prinzip in dem Spermatozoon zu finden wünschen, müssen wir ähnliche Experimente machen

wie Winkler begonnen hat[1]) Der Verfasser gebrauchte Extrakte des Spermatozoons und fand, daß solche Extrakte die Eier des Seeigels veranlaßte, das zwei und vierzellige Stadium zu erreichen. Da ein solches Resultat durch geringe Veränderungen des osmotischen Druckes oder der Beschaffenheit des Seewassers bewerkstelligt werden kann, und da solche Veränderungen in Winklers Experiment vorkamen, bin ich nicht sicher, daß diese Resultate durch die aus dem Spermatozoon ausgezogenen Substanzen veranlaßt wurden. Aber seine Experimente bewegen sich gewiß in der richtigen Richtung.

Die Vorstellung, daß das Spermatozoon und die Substanzen, welche Parthenogenese verursachen, nur katalytisch wirken, hat einen großen Einfluß auf die Theorie der Lebenserscheinung. Es bedeutet, daß, wenn wir die Prozesse der Zellteilung in dem reifen Ei (durch spezifische Katalysatoren) beschleunigen, das Ei leben kann, dagegen stirbt es, wenn diese Prozesse bei der gewöhnlichen Temperatur (wie es bei dem unbefruchteten Ei in normalem Seewasser der Fall ist) sich zu langsam vollziehen. Die Einführung der katalytischen Substanzen, welche die Prozesse der Entwicklung beschleunigen, retten das Leben des Eies. Dies kann durch folgende Annahme verständlich gemacht werden. Zwei Arten von Prozessen vollziehen

[1]) Winkler, Nachrichten der königlichen Gesellschaft der Wissenschaften, Göttingen. 1900.

sich in dem reifen Ei, nachdem es den Eierstock verlassen hat. Der eine führt zu der Bildung von Substanzen, welche das Ei töten, der andere führt zu der Bildung von Substanzen, welche Wachstum und Zellteilung zulassen und nicht giftig sind. Wir können als Erläuterung Pasteurs wohlbekannte Experimente über das Verhalten der Hefezellen bei dem Vorhandensein und der Abwesenheit des atmosphärischen Sauerstoffes gebrauchen. Bei dem Vorhandensein des Sauerstoffes vermehren sich die Hefezellen auf einer Zuckerlösung, während die Zymasewirkung verhältnismäßig gering ist. Bei Abwesenheit von Sauerstoff wird die Vermehrung der Zellen begrenzt oder kann aufhören, während die Zymasewirkung vorherrschender wird. Die Produkte der alkoholischen Gärung sind verhältnismäßig unschädlich für die Hefezelle, und aus diesem Grunde verursacht eine Vermehrung der Gärungstätigkeit der Zelle nicht das Absterben der Hefe. Ich stelle mir vor, daß es sich ähnlich mit der reifen Eizelle verhält, nachdem sie den Eierstock verlassen hat, vielleicht mit dem Unterschied, daß die (durch Fermentation) in dem Ei gebildeten Substanzen giftiger für das Ei sind, als der Alkohol und die anderen Gärungsprodukte es für die Hefe sind. Der Prozeß, welcher den Tod der Eizelle verursacht, und derjenige, welcher Zellteilung verursacht, sind wenigstens teilweise antagonistisch. Sie werden beide durch eine niedrige Temperatur gehemmt, so daß in diesem Falle der Tod

nicht stattfindet, ebensowenig aber eine Zellteilung möglich ist. Wenn es uns gelingt eine Substanz zu finden, welche den Prozeß der Teilung bei normaler Temperatur beschleunigt, wird dies zugleich zu einer Hemmung oder einer Verminderung des entgegengesetzten Prozesses, welcher das Leben verkürzt, führen. Bei dem Chaetopterusei wirkt eine ganz geringe Menge von K-Ionen als solch eine katalytische Substanz; möglicherweise eine Spur von H-Ionen, und vielleicht gewisse Substanzen, welche durch Verlust einer gewissen Wassermenge im Ei gebildet werden. Für das Echinodermenei kennen wir gegenwärtig nur den letzten Faktor. Außerdem gibt es katalytische Substanzen, welche von dem Spermatozoon mitgeführt oder erzeugt werden (Ionen? Enzyme?). Aber es gibt gewiß noch andere katalytische Substanzen, wie Geschwülste und Gallenblasen beweisen, bei welchen die Verschiedenheit der Struktur einer fast gleichen Verschiedenheit von Parasiten entspricht[1]). Es ist sehr

[1]) Wir brauchen nicht einen besonderen Parasiten für jede Art von Geschwulst anzunehmen. Teratome können auf der Basis einer parthenogenetischen Tendenz des Eies der Säugetiere erklärt werden in Verbindung mit irgend einer chemischen Veränderung, welche die katalytische Substanz liefert. Aber es ist nicht unmöglich, daß sogar bei gutartigen Geschwülsten ebenso wie in Teratomen, die katalytische Substanz durch parasitische Organismen veranlaßt werden kann.

Zusatz des Herausgebers: Daß ich dieser Ansicht Loebs nicht beipflichten kann, geht aus meinen Darlegungen in der Morphologie der Mißbildungen I. Kap. 9 und meinem Vortrag im naturh. med. Verein Heidelberg hervor. (Die Ent-

wichtig sich zu vergegenwärtigen, daß die Einführung der katalytischen Substanzen in das Ei sein Leben nicht verlängert, wenn nicht das Ei einen kritischen Punkt, der durch zwei Arten von Bedingungen bestimmt wird, erreicht hat. Die eine ist die Reife des Eies, die andere die Veränderung der umgebenden Bedingungen, welche für das Ei mit dem Verlassen des Eierstockes verbunden sind. So lange das Ei unreif ist, lebt es ohne die Einführung dieser Substanzen oder des Spermatozoons, und dies mag für das reife Ei zutreffen, so lange es in dem Eierstock verbleibt. Die Tatsache, daß es eine Altersgrenze für die Entwicklung des Karzinom gibt, mag eine ähnliche Erscheinung sein. Die katalytischen Substanzen, welche von dem Krebsparasiten abgegeben werden, können nicht die Zellteilung in den Epithelzellen herbeiführen, wenn nicht die letzteren einen kritischen Punkt erreicht haben, welcher wenigstens teilweise durch das Alter des Individuums bestimmt wird.

Im allgemeinen betrachten wir die Entwicklung als einen Prozeß, welcher sich nur in einer Richtung bewegen kann oder in andern Worten irreversibel (nicht

---

stehung der Geschwulst im Lichte der Teratologie. — Verh. des naturh. med. Ver. Heidelberg 1906.) Dagegen halte ich die Versuche Loebs über künstliche Parthenogenese auch für die Theorie der Geschwülste deshalb für sehr bedeutungsvoll, weil durch dieselben gezeigt wird, daß unter abweichenden Verhältnissen ein Wachstum erzeugt werden kann, das normal nicht stattfindet.

umkehrbar) ist. Aber das ist gewiß nicht stets der Fal
In einer neueren Arbeit zeigte ich, daß die morpho
genetischen Prozesse bei Hydroiden umkehrbar sinc
Wenn der Polyp einer Campanularia in Berührun
mit einem festen Körper gebracht wird, wird er i
undifferenziertes Material und später in einen Stolone
verwandelt. Wenn dasselbe Organ in Berührung mi
Seewasser gebracht wird, erzeugt es wieder eine
Polypen[1]). Derselbe Versuch kann mit Margelis un
anderen Hydroiden gemacht werden. Bei Antennulari
führt eine Veränderung in der Lage eines Zweiges mi
Polypen die Verwandlung dieser Materie in eine
Stolonen herbei. Zwischen diesen beiden Phase
muß die Materie durch eine undifferenzierte Stuf
gehen, in der sie weder Polyp noch Stolo ist. Es wir
unsere Aufgabe sein, zu bestimmen, wie weit di
Entwicklungsprozesse im Tierreich umkehrbar sind
Augenscheinlich wird bei einer Art mit reversible
Entwicklung der Tod nicht notwendigerweise in einem
gewissen Stadium der Entwicklung erfolgen (entspre-
chend dem Greisenalter beim Menschen).

Es ist nicht unmöglich, daß der „natürliche" Tod
mit der Situation, welche im reifen Ei vorhanden ist
nachdem es den Eierstock verläßt, verglichen werden
kann. Die Natur hat uns den Weg gezeigt, durch
welchen bei diesem kritischen Punkt im Ei der Tod
vermieden werden kann.

[1]) Stud. in gen. Phys. Teil II, S. 627.

IX.

Über Eireifung, natürlichen Tod und Verlängerung des Lebens beim unbefruchteten Seesternei (Asterias Forbesii) und deren Bedeutung für die Theorie der Befruchtung[1]).

1. Einleitung.

In früheren Arbeiten habe ich darauf hingewiesen, daß die Befruchtung des Eis ein lebensverlängernder Eingriff ist[2]). Das unbefruchtete reife Ei stirbt in verhältnismäßig kurzer Zeit. Infolge dieses Umstandes erlangt das Ei eine besondere Bedeutung als Versuchsmaterial für die Frage nach dem natürlichen Tod und der Verlängerung des Lebens. Es ist nämlich keineswegs entschieden, daß es einen „natürlichen" Tod gibt. Wir wissen nur, daß beim zunehmenden Alter eine kritische Periode eintritt, in der jedes Lebewesen stirbt unter dem Einfluß von Eingriffen, die den mehr jugendlichen Körper intakt lassen. Es mag daher von Interesse sein, daß wir, wie ich glaube,

[1]) Pflügers Archiv. Bd. 93 (1902), S. 59.

[2]) J. Loeb, Experiments on Artificial Parthenogenesis in Annelids (Chaetopterus) and the Nature of the Prozeß of Fertilization. American Journ. of Physiology vol. 4. 1901. — Loeb and Lewis, On the Prolongation of the Life of the Unfertilised Eggs of Sea-Urchins by Potassium Cyanide. Americ. Journ. of Physiology vol. 6. 1902.

nachzuweisen imstande sind, daß in dem Leben ge wisser Eier eine kritische Periode existiert, in der si eines „natürlichen" Todes sterben, und daß in diese Periode ihr Leben nur durch verschiedene äußer Eingriffe gerettet resp. verlängert werden kann.

Ein sehr günstiges Material für das Studium diese Frage bietet das Seesternei (Asterias Forbesii). Wen man dasselbe aus dem Ovarium entfernt, so ist es im allgemeinen „unreif", sobald es aber mit See wasser in Berührung kommt, fängt es an zu „reifen"

Morphologisch ist der unreife Zustand dadurch charakterisiert, daß das Ei einen sehr großen, deut lich sichtbaren Kern hat. Der Prozeß der Reifung besteht morphologisch darin, daß der Kern unsicht bar wird und die Polkörperchen ausgeworfen werden [1]) Dieser Prozeß mag in ein bis zwei Stunden im See wasser ablaufen, nachdem das Ei das Ovarium ver lassen hat. Erst nach Ablauf der Reifung gelingt es, das Ei durch ein Spermotozoon oder die physikali schen und chemischen Mittel, welche von mir, De lage, Mathews und Greeley mitgeteilt worden sind, zur Entwicklung zu bringen.

---

[1]) Durch neuere und sehr schöne Versuche von Delage ist dargetan worden, daß neben diesen sichtbaren Verände rungen im Kern auch chemische, morphologisch nicht sicht bare Veränderungen im Protoplasma erfolgen. Delage, Études expérimentales sur la maturation cytoplasmiques et sur la parthénogenèse artificielle chez les Échinodermes. Arch. de Zoologie expériment. vol. 9. 1901.

II. Der natürliche Tod der reifen unbefruchteten Seesterneier.

Die lebenden Eier von Asterias sehen leicht gelblich gefärbt und homogen aus. Dieses Aussehen behalten sie auch, wenn sie reifen, solange sie am Leben sind. Sie behalten dasselbe Aussehen, auch wenn sie durch den Eintritt eines Spermatozoons, oder durch die geeigneten chemischen und physikalischen Eingriffe zur Entwicklung gebracht werden.

Bleiben die reifen Eier aber unbefruchtet oder unentwickelt, so sterben sie im Verlaufe von vier bis zwölf Stunden, und dieser Prozeß des Absterbens ist von einer charakteristischen Farbenveränderung des Eis begleitet. Dasselbe wird nämlich erst dunkel, dann fast schwarz, und statt der homogenen Beschaffenheit des Protoplasmas erscheinen größere Tröpfchen oder Kügelchen im Inhalt. Wenn man etwa nach 24 Stunden eine solche Kultur von unbefruchteten Eiern unter dem Mikroskop ansieht, so findet man zwei Klassen von Eiern, erstens die eben geschilderten dunkeln toten Eier, welche reif sind und zweitens lebende, normal gefärbte, aber unreife Eier. Es reifen nämlich im allgemeinen nicht alle Eier sofort, die man dem Eierstock eines Seesterns entnimmt; manche reifen sehr spät, andere überhaupt nicht. Es läßt sich nun leicht beobachten, daß die unreifen Eier mehrere Tage lang am Leben bleiben, bis sie schließlich Bakterien

zum Opfer fallen, während die reifen Eier meist bereits in vier bis acht Stunden nach erlangter Reife dunkel werden und absterben.

Ist nun der Tod des reifen aber nicht zur Entwicklung veranlaßten Eis durch innere Vorgänge oder durch die im Seewasser enthaltenen Bakterien verursacht?

Ein sicherer Weg, um das festzustellen, besteht darin, sterile Reinkulturen von Eiern in Seewasser herzustellen. Das ist beim Seesternei verhältnismäßig einfach. Acht Flaschen wurden sterilisiert, dann mit sterilisiertem Seewasser gefüllt und dasselbe nochmals an drei aufeinander folgenden Tagen 20 Minuten lang auf 100° erhitzt. Ein weiblicher Seestern wurde äußerlich gründlich abgewaschen, ein Arm geöffnet und ein Ovarium mit sterilisierter Pinzette herausgenommen und in sterilisiertes Seewasser gebracht. Aus dem dicken Strom von Eiern, der sofort aus dem Ovarium austrat, wurden schnell mit einer sterilen Pipette je ein paar Tropfen in die sterilisierten Flaschen gebracht. Eine zweite Reihe von acht Flaschen enthielt normales Seewasser und in diese Flaschen wurden ebenfalls je ein paar Tropfen derselben Eier gebracht. Eine dritte Reihe von Flaschen wurde mit Seewasser gefüllt, dem je 2 ccm einer jauchigen stinkenden Kultur alter Seesterneier zugefügt wurden, um von vornherein eine kräftige Bakterienentwicklung zu veranlassen. Auch jede dieser

Flaschen erhielt Eier derselben Kultur, wie die sterilisierten Flaschen.

Daß nun die Sterilisierung der ersten acht Flaschen eine vollkommene war, wurde dadurch bewiesen, daß alle Flaschen während der Versuchsdauer völlig klar und ungetrübt blieben, und daß drei Flaschen, die bis heute noch nicht geöffnet worden sind, auch heute noch (nach sechs Wochen) völlig klar sind und jedes einzelne Ei klar erkennen lassen. Die Flaschen mit unsterilisiertem Seewasser wurden bereits nach 24 Stunden trübe, und nach zwei Tagen waren die Eier Bakterien zum Opfer gefallen und kein Ei mehr wahrnehmbar. Die sterilisierten Flaschen, die geöffnet wurden, waren stets völlig frei von Fäulnisgeruch, während die nicht sterilisierten Flaschen schon nach ein bis zwei Tagen einen penetranten Fäulnisgeruch hatten. Die mikroskopische Untersuchung des Seewassers auf Bakterien blieb stets völlig negativ in den sterilisierten Flaschen, und fiel stets positiv aus in den anderen Flaschen. In denjenigen Flaschen, denen je 2 ccm der fauligen Kultur von Seesterneiern zugefügt worden war, waren Bakterien und Infusorien von vornherein äußerst zahlreich.

Sechs Stunden nach Beginn des Versuches wurde je eine Flasche der drei Reihen geöffnet und die Eier mikroskopisch untersucht. Das Bild war in allen drei Flaschen das gleiche: Fast alle Eier waren reif und eine kleine Zahl von Eiern dunkel oder

schwarz. Was aber für uns von entscheidender Bedeutung ist, ist der Umstand, daß die Prozentzahl der dunkeln, abgestorbenen Eier in der sterilen Kultur genau so groß, wenn nicht größer war, als in dem unsterilisierten oder dem faulig gemachten Seewasser.

Zwölf Stunden später, also achtzehn Stunden nach Beginn des Versuches, wurde wieder je eine Flasche der drei Kulturen geöffnet. Diesmal waren fast alle Eier der sterilen Kultur dunkel oder schwarz, und einzelne zeigten bereits Zerfall in Kügelchen. Von den Eiern in den beiden anderen Kulturen war derselbe Prozentsatz dunkel. Also die Eier sterben ebenso rasch (oder vielleicht rascher) in den sterilisierten Flaschen, die absolut bakterienfrei sind, wie in den bakterienhaltigen Flaschen. Der Tod erfolgt durch innere Ursachen und so rasch, daß die im Seewasser vorhandenen spärlichen Bakterien den Tod der Eier kaum zu beschleunigen imstande sind. Die Eier sind eben bereits durch innere Ursachen gestorben, ehe die Bakterien sich in solcher Menge an ihrer Oberfläche festsetzen können, daß sie das Leben gefährden.

Die später geöffneten Flaschen bestätigten nur das Gesagte. Der Versuch wurde mit demselben Erfolg wiederholt. Jede der Flaschen, die in den ersten Tagen geöffnet wurden, enthielt auch eine kleine Zahl lebender, hell aussehender Eier. Die letzteren waren aber ausnahmslos unreif. Der Ver-

such beweist also, daß die gereiften Eier des Seesterns in wenigen Stunden zugrunde gehen, und daß die Ursache für den Tod nicht in Bakterien des Seewassers gesucht werden darf; und ferner, daß unter genau denselben Umständen die unreifen Eier am Leben bleiben!

III. Die chemischen Bedingungen für die Reifung des Seesterneies.

Da die Eier von Asterias im Ovarium im allgemeinen unreif sind, da sie aber zum Teil wenigstens in ein bis zwei Stunden reifen, wenn sie ins Seewasser gebracht werden, so lag der Verdacht nahe, daß irgend eine im Seewasser enthaltene Substanz die Reifung bedinge. Um zu ermitteln, welche Substanz das sei, wurden eine Reihe von Lösungen hergestellt, die nahezu den osmotischen Druck des Seewassers besaßen. Das Resultat war so einfach, daß es nicht nötig ist, alle Versuche hier zu erwähnen. Es stellte sich nämlich heraus, daß, wenn die Eier in Lösungen gebracht wurden, welche freie Hydroxylionen enthielten, die Reifung alsbald eintrat, während in Lösungen ohne Hydroxylionen die Reifung unterblieb. So behielten beispielsweise die Eier ihren Kern in reinen $\frac{5}{8}$ n NaCl-Lösungen, oder in NaCl-Lösungen, denen man etwas Kalium oder Calcium zugesetzt hatte. Wenn man aber zu je 100 ccm

solcher Lösungen $^1/_2$—2 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zusetzte, so trat die Reifung alsbald ein, d. h. der Kern wurde unsichtbar und Polkörperchen wurden ausgeworfen. Da nun das Seewasser freie Hydroxylionen enthält, so ließ sich der Schluß ziehen, daß dieselben eine der Ursachen für das Reifen des Seesterneis bilden. Es war möglich, diese Annahme durch weitere Versuche zu prüfen. Wenn man dem Seewasser kleine Quantitäten Säure zufügt, so verschwinden die freien HO-Ionen, und das Wasser zeigt (bei Zusatz von $1^1/_2$ ccm oder mehr $\frac{n}{10}$ HCl zu 100 ccm Seewasser) saure Reaktion. Es wurden deshalb unreife Eier direkt in Seewasser gebracht, dem 1, 2, 3 und 4 ccm einer $\frac{n}{10}$ HNO_3-Lösung zu je 100 ccm Seewasser zugesetzt waren. Während nun in normalem Seewasser wie gewöhnlich ein hoher Prozentsatz von Eiern alsbald reiften, unterblieb die Reifung bei der überwiegenden Mehrzahl oder selbst bei allen Eiern in dem Seewasser, dem 2 ccm oder mehr Säure zugesetzt war. Auch der Zusatz von 1 ccm Säure bedingte bereits eine Verminderung in der Zahl der reifenden Eier. Es ist aber nicht einmal nötig, die Eier dauernd in neutrales oder saures Seewasser zu bringen, um die Reifung zu verhindern. Wenn man zu 100 ccm Seewasser 4 oder 5 ccm einer $\frac{n}{10}$ HNO_3-Lösung zusetzt und unreife Eier nur etwa 15 Minuten in eine solche Lösung bringt, so reifen relativ wenig Eier,

wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht werden. Solches Seewasser tötet die Seesterneier keineswegs. Wir werden vielmehr später sehen, daß dasselbe hier erwähnte Verfahren, welches, wenn es auf unreife Eier angewendet wird, die Reifung hindert, auf reife Eier angewendet, künstliche Parthenogenese veranlaßt[1]). Außerdem habe ich mich auch davon überzeugt, daß die Eier, welche im unreifen Zustand in angesäuertes Seewasser gebracht wurden, wenn sie hinterher reiften, auch durch Sperma befruchtet werden konnten. — Es stimmt mit dem Gesagten möglicherweise auch überein, daß Zusatz von kleinen Mengen $NaHCO_3$ und größeren Mengen Natriumzitrat zum Seewasser die Reifungsvorgänge beschleunigt. In den Lösungen beider Stoffe sind freie Hydroxylionen vorhanden, und es wäre möglich, daß Zusatz derselben zu Seewasser auch die Konzentration der freien Hydroxylionen im Seewasser um ein geringes erhöht.

Die Hydroxylionen sind aber sicher nicht die einzige Substanz im Seewasser, welche die Reifung des Seesterneies fördert oder veranlaßt. Es fiel mir bald auf, daß, wenn man verschiedene Proben von Eiern derselben Kultur nimmt und den Prozentgehalt der reifen Eier feststellt, dieser Prozentgehalt den größten Schwankungen unterliegt. Die Ursache dieser Schwankungen wurde bald entdeckt. Es fand sich

[1]) Loeb, Fischer und Neilson, Weitere Versuche über künstliche Parthenogenese. Pflügers Archiv Bd. 87. 1901.

nämlich, daß, wo die Eier auf einem dicken Haufen lagen, die Reifung langsam erfolgte, daß aber, wo sie in einer sehr dünnen Schicht ausgebreitet lagen, die Reifung rasch erfolgte. Das wies auf die Bedeutung des Sauerstoffs für die Reifung hin. Wo die Eier in einem dicken Haufen liegen, verhindert die Sauerstoffzehrung der oberflächlichen Eier die Diffusion desselben zu den tiefer gelegenen Eiern.

Es wurden nun Versuche angestellt, in denen der Sauerstoff einer kleinen Flasche mit wenig Seewasser durch Wasserstoff verdrängt wurde. Wenn in derartigen Versuchen aller Sauerstoff einwandsfrei verdrängt war, so unterblieb auch die Eireifung in allen oder doch der Mehrzahl der Eier, trotz der Gegenwart der Hydroxylionen des Seewassers. Es sind also mindestens zwei Stoffe des Seewassers, welche die Reifung veranlassen oder beschleunigen, der Sauerstoff und die Hydroxylionen. Möglicherweise sind noch andere Bestandteile des Seewassers dabei beteiligt, aber NaCl, Ca und K haben anscheinend keinen fördernden Einfluß auf die Reifung[1]). Es scheint also, daß der Mangel an Sauerstoff und Hydroxylionen im Ovarium zu den Umständen gehören, welche die Reifung der Eier im Ovarium verzögern.

---

[1]) Professor Whitman teilte mir mit, daß auch bei Clepsine die Reifung der Eier erst beginnt, nachdem sie abgelegt sind. Möglicherweise ist auch hier der Sauerstoffgehalt des Wassers die Vorbedingung der Eireifung.

IV. Die Verlängerung der Lebensdauer des unbefruchteten Seesterneis durch Verhinderung der Reifung.

Wir haben früher erwähnt, daß die reifen Eier einer Kultur unbefruchteter Seesterneier in kurzer Zeit (die mit zunehmender Temperatur abnimmt) sterben, während die unreifen Eier relativ lange am Leben bleiben. Es war nun nötig, nachzuweisen, daß, wenn man die Reifung einer Kultur von unbefruchteten Eiern von Asterias künstlich verhindert, die Eier länger am Leben bleiben. Dieser Nachweis gelingt sehr schön.

Wir beginnen mit dem technisch einfachsten Verfahren. Die aus dem Ovarium ausströmenden Eier werden in zwei Teile geteilt. Eine Partie wird vorsichtig ohne Erschütterung durch vorsichtiges Neigen des Gefäßes in dünner Lage auf dem Boden des Gefäßes ausgebreitet. Das Gefäß darf keine hohen Wände haben und die Schicht Seewasser über den Eiern muß niedrig sein, so daß die Sauerstoffdiffusion zu den Eiern erleichtert ist. Eine zweite Portion wird ebenso vorsichtig in eine unten zugeschmolzene Glasröhre mit kleinem Lumen gebracht. Man füllt die Glasröhre halb voll mit Eiern, so daß man sicher sein darf, daß die tieferen Lagen der Eier in der Pipette wenig oder gar keinen Sauerstoff erhalten. Es versteht sich von selbst, daß man die Eier in die Röhre tun muß, unmittelbar sobald

sie gelegt sind. Wenn man nun nach 24 Stunden die flach ausgebreiteten, mit Sauerstoff reichlich versorgten Eier mit denjenigen vergleicht, die am Boden der Glasröhre lagen, so findet man einen auffallenden Unterschied. Die mit Sauerstoff reichlich versorgten Eier haben einen viel größeren Prozentsatz reifer, abgestorbener und schwarz gewordener Eier, als die in Sauerstoffarmut gehaltenen Eier. Unter den letzteren überwiegen die unreifen Eier, die am Leben sind, und von denen ein Teil reift, wenn sie in dünner Schicht ausgebreitet werden. Gerade diese Versuche eignen sich auch besonders, um darzutun, daß der rasche Tod des reifen unbefruchteten Seeigeleies durch innere Ursachen und nicht durch die im Seewasser enthaltenen Bakterien bedingt ist. Ich will ein Beispiel anführen.

Ein Teil der Eier war flach ausgebreitet, ein anderer lag in derselben Schale in einem dicken Haufen. Das Seewasser war das gleiche. Die ersteren Eier reiften in wenigen Stunden und waren in weniger als zwölf Stunden alle dunkel und tot, als das Wasser noch völlig klar und ohne Fäulnisgeruch war. Nach 24 Stunden stellte sich fauliger Geruch ein und das Wasser enthielt viele Bakterien. Noch nach drei Tagen, als das Wasser entsetzlich stinkend und trübe war, war noch ein Teil der Eier, die in einem dicken Haufen, also in Sauerstoffarmut, gewesen waren, unreif und am

Leben. Dieselben wurden in frisches Wasser gebracht und in dünner Schicht ausgebreitet. Sie reiften und entwickelten sich auf Spermazusatz zu schwimmenden Larven. Es versteht sich natürlich von selbst, daß auch unreife Eier Bakterien zum Opfer fallen können, und daß sie auf diese Weise schließlich im Seewasser zugrunde gehen.

Derselbe Versuch läßt sich etwas umständlicher mit reinem Sauerstoff und Wasserstoff anstellen. Frischgelegte Eier einer Asterias wurden in zwei Reihen von acht Flaschen verteilt. Die eine Reihe von Flaschen war mit einem Wasserstoff-Entwicklungsapparat verbunden, die andere mit einer Bombe, welche reinen Sauerstoff enthielt. Vor Beginn des Versuches war in der einen Flaschenreihe alle Luft durch den Wasserstoffstrom verdrängt worden. Während des Versuches wurde ein mächtiger Wasserstoffstrom unterhalten. Beide Reihen von Flaschen erhielten frischgelegte unreife Eier von Asterias. Der Versuch dauerte drei Tage, und von Zeit zu Zeit wurde eine Flasche weggenommen und auf ihren Inhalt untersucht. Die Eier, welche dem Sauerstoffstrom ausgesetzt waren, reiften ebenso rasch und zahlreich wie die in gewöhnlichem Seewasser, und die gereiften Eier starben alsbald ab. Im Wasserstoffstrom unterblieb die Reifung bei der Mehrzahl der Eier, und dieselben blieben am Leben. In den Wasserstoffkulturen fand eine starke Entwicklung von Bakterien statt,

während das in den Sauerstoffkulturen gar nicht oder nur in geringem Maße stattfand[1]).

Auch die Säurebehandlung, welche, wie oben erwähnt, die Reifung des Eies verhindert (ohne dasselbe abzutöten), verhindert den Tod und Zerfall des Eies. Eier, welche, ohne mit reinem Seewasser in Berührung gewesen zu sein, 10 oder 15 Minuten lang in 100 ccm Seewasser + 4 ccm $\frac{n}{10}$ HCl gebracht werden, reifen viel langsamer oder überhaupt nicht, wenn sie nach dieser Zeit in normales Seewasser zurückgebracht werden. Sie behalten aber auch, solange sie unreif sind, das helle normale Aussehen lebender Eier, bis sie schließlich Bakterien zum Opfer fallen. Auch unreife Eier, welche in neutrales Seewasser gebracht werden, reifen meist nicht und behalten, wenn sie unreif bleiben, ihr normales Aussehen.

Es scheint aus diesen Versuchen zu folgen, daß derselbe Vorgang, welcher der Reifung der Seesterneier zugrunde liegt, auch zum Tode derselben führt, (wenn er nicht durch die Eingriffe, welche wir als Befruchtung bezeichnen, gehemmt wird). Ich versuchte nun, ob

---

[1]) Bei diesen Versuchen muß darauf geachtet werden, daß in den Wasserstoffflaschen die Luft auch aus dem Seewasser gründlich entfernt ist, ehe die Eier hineingetan werden. Natürlich muß auch der Wasserstoffapparat vorher sicher luftfrei sein.

es auch möglich sei, durch Sauerstoffmangel das gereifte Ei länger am Leben zu erhalten. Ich erhielt in der Tat einige positive Resultate in dieser Hinsicht. Eier eines Seesterns wurden in dünner Lage ausgebreitet. Nach drei Stunden waren 75% der Eier gereift. Ein Teil der reifen Eier wurde vorsichtig in die oben erwähnte Glasröhre gebracht, wo die tieferen Schichten derselben Sauerstoffmangel litten. Eine zweite Portion wurde in kleine Flaschen gebracht, durch die ein beständiger Strom von reinem Sauerstoff geleitet wurde. Am nächsten Morgen, also 15 Stunden, nachdem die Eier in Sauerstoff gebracht waren, wurden die verschiedenen Portionen der Eier untersucht. Die in den Sauerstoffstrom gebrachten Eier zeigten in einem Gefäß 98% reife und dunkle, tote und 2% unreife, lebende Eier. Die in normalem Seewasser gebliebenen Eier hatten etwa wie vorher 75% reife Eier, die aber alle schwarz und tot waren, mit Ausnahme von ein paar Eiern, die angefangen hatten, sich zu furchen[1]) und am Leben waren. Ebenso waren die unreifen Eier am Leben. Die Eier dagegen, welche in der Glasröhre in völliger oder relativ hoher Sauerstoffarmut gewesen waren, waren fast alle am Leben! Diese Beobachtung deutet in der Tat darauf hin, daß derselbe Vorgang,

[1]) Diese Furchung war möglicherweise veranlaßt durch die mechanische Erschütterung; ich hatte die Eier wiederholt geschüttelt, um die Durchlüftung des Seewassers zu erleichtern.

welcher zur Reifung des Eies führt, den Tod des Eies herbeiführt, falls er nicht rechtzeitig gehemmt wird. Auf diese Weise wird der Befruchtungsvorgang zum lebensrettenden oder lebensverlängernden Akt.

V. Haben diese Tatsachen bei anderen Formen Gültigkeit?

Die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Reifung und dem natürlichen Tode des Eies läßt sich gerade beim Seesternei so schön feststellen, weil es uns gelingt, dieses im unreifen Zustand zu erlangen und weil die Reifung so rasch erfolgt. Beim Seeigelei liegen die Dinge viel ungünstiger, da dieses Ei im Ovarium reift und es schwer ist, in der Laichperiode unreife Eier zu erhalten. Es ist mir deshalb nicht möglich gewesen, festzustellen, welche chemischen Umstände die Reifung des Seeigeleies bedingen, und es war deshalb ferner unmöglich, festzustellen, ob dieselben Umstände auch das Absterben des Eies bedingen und ob durch Verhinderung dieser Umstände die Lebensdauer des Seeigeleies verlängert werden kann. Auf indirektem Wege haben Lewis und ich im vorigen Jahr diese Frage zu entscheiden versucht, indem wir die Annahme machten, daß die destruktiven Prozesse, welche den Tod des unbefruchteten Eies herbeiführen, enzymatische (autolytische?) Vorgänge seien, welche durch Gifte wie

KCN gehemmt werden könnten[1]). In der Tat gelang es uns, zu zeigen, daß Zusatz einer geringen Quantität von KCN zu unbefruchteten Seeigeleiern die Lebensdauer derselben erheblich zu verlängern imstande ist. Noch nach sieben Tagen lassen sich solche Eier befruchten, sobald sie in normales Seewasser zurückgebracht werden. Allein wir wiesen darauf hin, daß wegen der bekannten bakteriziden Eigenschaften des Cyankaliums die Versuche an Seeigeleiern an sich nicht entscheidend sind, und begannen Versuche an Seesterneiern[1]), die aber damals nicht zu Ende geführt werden konnten. Wenn man Eier hat, die so langlebig sind wie Seeigeleier, so ist die starke Entwicklung von Bakterien im normalen Seewasser unvermeidlich, da stets einzelne Eier absterben und die abgestorbenen Eier ein ausgezeichnetes Nährmedium für die weitere Entwicklung von Bakterien abgeben. Es braucht deshalb auch Niemanden zu überraschen, daß die unbefruchteten Eier von Seeigeln, wie ich dieses Jahr feststellen konnte, auch in sterilisiertem Seewasser fünf Tage lang am Leben bleiben können, während sie in normalem Seewasser viel früher absterben (ca. zwei Tage).

Es bestehen offenbar große Verschiedenheiten in bezug auf die Lebensdauer des unbefruchteten Eies bei verschiedenen Spezies. Es macht fast den Ein-

[1]) Loeb und Lewis, American Journal of Physiology vol 6. 1902.

druck, als ob bei gewissen höheren Tieren Eier vorkommen, die nur dann zur Entwicklung gelangen, wenn sie unmittelbar nach dem Verlassen des Ovariums befruchtet werden. Harper hat an der hiesigen Universität unter Leitung von Professer C. O. Whitman kürzlich festgestellt, daß das Ei bei Tauben in dem Augenblick befruchtet wird, wo es das Ovarium verläßt. Der Sperm lebt in einer gelatinösen Masse auf der Oberfläche der Ovarien[1]), so daß für den nötigen Kontakt zwischen Sperm und Ei hier gesorgt ist. Das beseitigt auch die Schwierigkeit, die viele darin gefunden haben, zu erklären, wie bei Tieren mit innerer Begattung die Spermatozoen den Weg zum Ei finden. Bestimmte direktive Kräfte sind hierzu anscheinend nicht nötig, da ein Teil derselben, vermöge ihrer Beweglichkeit, durch Uterus und Eileiter auf das Ovarium gelangen muß. Ähnliche Untersuchungen wie die von Harper bei Tauben sind bei Säugetieren noch nicht angestellt, allein es unterliegt keinem Zweifel, daß auch das Säugetierei bei vielen Arten befruchtet wird, ehe es den Uterus erreicht. Die Fälle von Abdominalschwangerschaft weisen auf die Möglichkeit hin, daß auch hier die Befruchtung an der Oberfläche des Ovariums erfolgen könnte.

[1]) Die Spermatozoen sind im allgemeinen viel langlebiger als die Eier, obwohl auch in der Beziehung starke Unterschiede bei verschiedenen Tieren bestehen mögen. In der Samentasche der Bienenkönigin sollen Spermatozoen länger als ein Jahr nach der Begattung am Leben bleiben.

VI. Verlängerung des Lebens und die Theorie der Befruchtung.

Durch unsere Versuche scheint sicher gestellt zu sein, daß das unbefruchtete reife Seesternei in wenigen Stunden durch innere Vorgänge abstirbt, und daß der Vorgang der Befruchtung das Leben des Eies rettet. Das gilt nicht nur für die Befruchtung des Seesterneies durch Spermatozoen, sondern auch für die chemische Befruchtung durch Wasserstoffionen. Mr. Neilson ist es gelungen, die parthenogenetischen Larven des Seesterns für viel längere Zeit am Leben zu erhalten, als das bisher der Fall war, und das Gleiche ist Herrn Dr. Fischer für die osmotisch aus unbefruchteten Seeigeleiern erzeugten Larven gelungen. Es ist so die Möglichkeit, wenn nicht Wahrscheinlichkeit vorhanden, daß die chemische oder osmotische Befruchtung dieser Eier zu einer ebenso langen Lebensdauer der Larven führen kann als die Befruchtung des Eies durch Sperm.

Wie aber können das Spermatozoon oder die dasselbe ersetzenden physikalischen Eingriffe das Leben des Eies retten, und warum stirbt das reife Ei ab, wenn es nicht durch Sperm oder gewisse künstliche Eingriffe befruchtet wird? Ich glaube, die Antwort darauf lautet, daß durch die befruchtenden Agentien Stoffwechselvorgänge beschleunigt werden, welche vorher im Ei nur schwach existierten. Es finden Zellteilungen und später Wachstum des Eies statt, was

vor der Befruchtung durch das Spermatozoon oder die dasselbe ersetzenden chemischen oder physikalischen Eingriffe nicht der Fall war. Wachstum ist nicht denkbar ohne ein Überwiegen synthetischer Prozesse über Spaltungsvorgänge. Ich halte es für möglich, daß der entscheidende Schritt im Chemismus des Eies, der durch die Befruchtnng in Gang gesetzt wird, darin besteht, daß synthetische Prozesse im Ei beschleunigt werden. Werden diese Prozesse nicht in Gang gesetzt oder verstärkt, so stirbt das Ei. Der Schwund von Material, der im hohen Alter statt hat, weist ebenfalls auf ein Zurücktreten der Synthesen hin. Ob die zweite kritische Periode, welche im gealterten Tier eintritt, mit der kritischen Periode des Eies eine Ähnlichkeit hat, läßt sich einstweilen nicht feststellen. Es läßt sich also auch vorläufig nicht feststellen, ob und wie in dieser Periode eine radikale Verlängerung des Lebens erzielt werden kann. Es wäre möglich, daß auch hier die Frage nach der Verlängerung des Lebens auf die Frage nach der Möglichkeit der Beschleunigung der synthetischen Prozesse hinausläuft.

Wir kommen also zu dem Schluß, daß durch die Befruchtung eine Klasse von chemischen Vorgängen (Synthesen?) im Ei beschleunigt wird, die bei den Eiern der meisten Tiere ohne spermatische, chemische oder osmotische Befruchtung nicht in genügender Stärke existiert. Warum aber stirbt das reife Ei,

wenn diese Vorgänge nicht beschleunigt werden, und warum bleibt es am Leben, ehe es reif ist? Es muß ja im Ovarium im unreifen Zustande oft jahrelang existieren? Darauf kann ich nur mit der Vermutung antworten, daß die der Eireifung zugrunde liegenden Vorgänge destruktiver Natur sind (man könnte an autolytische Vorgänge denken), die das Ei nicht unbegrenzt lange vertragen kann, ohne abzusterben. Bei manchen Eiern mag die Intensität dieser zerstörenden (autolytischen?) Vorgänge größer sein als bei anderen, und das mag die Unterschiede in der Geschwindigkeit, mit der das unbefruchtete reife Ei abstirbt, bedingen. Damit würde es übereinstimmen, daß, wenn man die Reifung verhindert, oder das reife Ei unter Bedingungen setzt, die den Prozeß der Eireifung resp. die ihm zugrunde liegenden chemischen Vorgänge hemmen, auch das Leben des Eies verlängert werden kann. So wirken beim Seesternei Sauerstoffmangel, Säure, und beim Seesternei und Seeigelei ein geringer Zusatz von Cyankalium. Da aber alle diese Mittel das Ei indirekt schädigen und auch die zerstörenden (autolytischen?) Vorgänge nicht gänzlich unterdrücken, so ist die Verlängerung des Lebens durch diese Eingriffe geringer als durch die Befruchtung, bei der die Verlängerung des Lebens nicht bloß durch Hemmung zerstörender, sondern durch Beschleunigung der aufbauenden Vorgänge erzielt wird.

Daß nun in der Tat die der Eireifung zugrunde liegenden chemischen Vorgänge nicht identisch sind mit den durch die Befruchtung veranlaßten, scheint durch die obenerwähnte Beobachtung gestützt zu werden, daß derselbe Eingriff — nämlich die Behandlung mit Säure —, der das reife Ei veranlaßt, sich zu entwickeln und über das Bipinnariastadium hinaus zu leben, das unreife Ei an der Reifung verhindert. Wenn man die reifen unbefruchteten Eier eines Seesterns 15 bis 60 Minuten in eine Mischung von 100 ccm Seewasser + 3 ccm $\frac{n}{10}$ HCl bringt, so können sich in günstigen Fällen 90% der Eier zu Larven entwickeln. Wenn man aber die Eier vor der Reifung ebenso lange in eine solche Lösung bringt, so verhindert man damit dauernd oder für lange Zeit die Reifung der Eier[1]). Noch auffallender wird der Unterschied, wenn man eine Mischung von 100 ccm Seewasser und 5 ccm $\frac{n}{10}$ HCl benutzt, die Eier aber kürzere Zeit in der Lösung läßt. Das zeigt, daß Säure den Entwicklungsvorgang und den Reifungsvorgang in entgegengesetztem oder mindestens nicht gleichem Sinne beeinflußt[1]).

---

[1]) Die Eier, die später trotz der voraufgegangenen Säurebehandlung reifen, beginnen sich oft auch nach erfolgter Reifung zu furchen und zu Larven zu entwickeln, während die in normalem Seewasser gereiften Kontrolleier sich nicht entwickeln.

Wir müssen nun die Frage erörtern: Wie fügen sich die natürlich parthenogenetischen Eier diesen Vorstellungen, z. B. die Eier von Bienen?

Bei natürlich parthenogenetischen Eiern hat es den Anschein, als ob die Vorgänge, die der Eireifung zugrunde liegen, kontinuierlich in die der Entwicklung zugrunde liegenden übergehen. Es ist aber möglich, daß das nur scheinbar der Fall ist, und daß in Wirklichkeit die Sache sich vielleicht so verhält, daß bei den der Eireifung in parthenogenetischen Formen zugrunde liegenden Vorgängen ein Stoffwechselprodukt gebildet wird, das die Entwicklungsvorgänge begünstigt. Wir wissen, daß ein außerordentlich kleiner Betrag von Wasserstoffionen beim unbefruchteten Seesternei ausreicht, die Entwicklung hervorzubringen, und daß das Gleiche beim Amphitriteei durch eine ebenso geringe Menge von Calciumionen und beim Chaetopterusei durch eine ebenso winzige Menge von Kaliumionen geleistet wird[1]). Es ist durchaus möglich, daß beim Bienenei gerade die für die Anregung seiner Entwicklung nötigen spezifischen Ionen oder sonstigen Stoffe im Innern des Eies selbst durch (oder im Anschluß an) die bei der Eireifung stattfindenden Prozesse gebildet werden, und daß ohne die Bildung dieser Stoffe die Entwicklung nicht möglich wäre.

---

[1]) Loeb, Neilson und Fischer, l. c.

Auch beim Seeigel- und Seesternei liegen Angaben vor, welche den Anschein erwecken könnten, als ob Eireifungsvorgänge und Entwicklungsvorgänge kontinuierlich ineinander übergingen. Es ist nämlich häufig beobachtet worden, daß die unbefruchteten Eier bei diesen Formen kurz vor ihrem Tode, nachdem sie etwa 24 Stunden in „normalem" Seewasser gelegen haben, anfangen sich zu furchen. Diese Furchung geht aber nie über das Zwei- oder Vierzellenstadium hinaus. Das konnte man damit erklären, daß eben die Eier um diese Zeit anfangen abzusterben. Nachdem ich dieses Jahr gefunden hatte, daß in sterilisiertem Seewasser die Seeigeleier fünf Tage lang (bei Sommertemperatur) ihre volle Befruchtungsfähigkeit bewahren können, beschloß ich, diese Angabe über spontane Furchung etwas näher zu prüfen. Wenn es wahr wäre, daß einzelne Seeigeleier in normalem Seewasser nach etwa 20 Stunden anfangen, sich zu furchen und nur deshalb in ihrer Entwicklung nicht weitergehen, weil sie alsbald sterben, so sollte man erwarten, daß, wenn man sie fünf Tage lang am Leben erhält, sehr viele oder alle sich furchen müßten und eine Reihe von Eiern ein ziemlich fortgeschrittenes Stadium der Entwicklung erreichen müßten. Die Seeigeleier waren in einer Reihe von Flaschen mit sterilisiertem Seewasser verteilt. Jeden Morgen wurde eine Flasche geöffnet und sorgfältig auf gefurchte Eier untersucht.

Ich fand während der fünf Tage auch nicht ein einziges gefurchtes Ei, weder im Zweizellenstadium noch in späteren Furchungsstadien. Es könnte möglich sein, daß in den letzten Tagen des Versuches einzelne wenige Eier sich furchten und daß die Furchungskugeln auseinander fielen. Lewis und ich hatten nämlich voriges Jahr gefunden, daß, wenn Eier 48 Stunden oder später befruchtet werden, sie keine Membran bilden und die Furchungskugeln auseinander fallen. Ich habe diese Tatsache dieses Jahr bestätigt. Aus solchen Eiern geht meist mehr als ein Embryo hervor wegen des Auseinanderfallens der Zellen. Ich achtete auf diese Möglichkeit und will nicht in Abrede stellen, daß einzelne kleine Eier vorhanden waren, die vielleicht nur die Hälfte der Masse eines gewöhnlichen Eies repräsentierten. Aber fast alle Eier hatten normale Größe, und da ferner normalerweise gelegentlich kleinere Eier vorkommen, so beweist der Versuch, daß auch bei Seeigeleiern die Eireifungsprozesse nicht kontinuierlich in die Furchung übergehen, sondern daß hierzu ein ganz bestimmter Eingriff nötig ist, den wir durch Wasserentziehung oder durch ein Spermatozoon hervorrufen können. Man wende nicht ein, daß etwa das sterilisierte Wasser die Furchung verhinderte. Dieselben Eier wurden nach Ablauf des Versuches im sterilisierten Wasser durch Zusatz von einem Tropfen Samen befruchtet und entwickelten sich im sterilisierten Seewasser zum Pluteusstadium.

Ich halte es also für möglich, daß, wo Autoren eine Furchung von unbefruchteten Seeigeleiern in „normalem" Seewasser beobachteten, das letztere oder die Eier in Wirklichkeit eine Veränderung erlitten hatten, welche den Beobachtern entgangen war. Man könnte an Verdunstung und dadurch hervorgerufene Zunahme des osmotischen Druckes des Seewassers denken. Eine sehr geringe Zunahme des osmotischen Druckes des Seewassers reicht aus, um in 20 Stunden eine Zweiteilung des Seeigeleies zu veranlassen. Man könnte auch an eine Veränderung des Seewassers infolge der Fäulnisvorgänge in den absterbenden Eiern denken. Endlich ist die Möglichkeit vorhanden, daß im absterbenden Ei gelegentlich ein Stoff gebildet werden könnte (z. B. eine Säure), welche eine einzelne Furchung des Eies veranlaßt.

Die Beziehungen, welche zwischen Eireifung und natürlichem Tod einerseits und zwischen Befruchtung und Verlängerung des Lebens andererseits bestehen, führen uns zu der Anschauung, daß eine „Befruchtung" möglicherweise in jedem Ei stattfinden muß, auch im natürlich parthenogenetischen Ei. Nur ist nach unserer Auffassung der Akt der Befruchtung nicht identisch mit dem morphologischen Vorgang, der als Befruchtung bezeichnet wird, sondern es ist ein chemischer oder physikalisch-chemischer Akt, der gewisse (synthetische?) Stoffwechselvorgänge im Ei, welche natürlicherweise in demselben ablaufen, aber viel zu

langsam, beschleunigt. Der Unterschied zwischen natürlich parthenogenetischen Eiern und den Eiern, welche befruchtet werden müssen, besteht vielleicht darin, daß den letzteren die katalytisch wirkende Substanz oder Komplex von Bedingungen von außen zugeführt werden muß, um die betreffenden (synthetischen?) Vorgänge zu beschleunigen, während in den natürlich parthenogenetischen Eiern diese Substanzen im Innern (möglicherweise im Anschluß an die Eireifungsvorgänge) gebildet werden könnten.

Der Zusammenhang zwischen der Verlängerung des Lebens und der Befruchtung weist wohl deutlich darauf hin, daß jede rein morphologische Theorie der Befruchtung unvollständig ist, und daß eine wirkliche Theorie dieses Vorganges eine physikalisch-chemische Form haben muß. Ich möchte an dieser Ansicht auch einem so hervorragenden Forscher gegenüber, wie Boveri, festhalten. Den Weg zur Erreichung dieses Zieles sehe ich in weiteren Versuchen zur Hervorbringung der Entwicklung unbefruchteter Eier durch möglichst eindeutige physikalische und chemische Eingriffe.

VII. Schlußfolgerungen.

1. Unsere Beobachtungen und Versuche scheinen darzutun, daß in demselben Seewasser und unter denselben sonstigen Bedingungen reife, aber unbefruchtete Seesterneier rasch sterben, während un-

reife sowohl wie reife befruchtete Eier länger oder dauernd am Leben bleiben.

2. Es scheint sicher zu sein, daß der rasche Tod der reifen unbefruchteten Seesterneier durch innere mit der Reifung zusammenhängende Vorgänge und nicht durch die Bakterien des Seewassers bedingt ist, da erstens in sterilisiertem, bakterienfreiem Seewasser der Tod reifer Eier ebenso rasch erfolgt wie in nicht sterilisiertem Seewasser, und da ferner Eier, welche künstlich an der Reifung verhindert werden, auch in stark bakterienhaltigem Wasser längere Zeit am Leben bleiben können.

3. Wir haben gezeigt, daß Sauerstoff und freie Hydroxylionen die Reifung der Seesterneier beschleunigen, daß dagegen Sauerstoffarmut und eine neutrale oder schwach saure Reaktion des Seewassers die Reifung hemmt oder verhindert. Die Tatsache, daß die Eier, die im Ovarium des Seesterns unreif blieben, reifen, sobald sie ins Seewasser kommen, scheint dadurch wenigstens teilweise ihre Erklärung zu finden.

4. Wenn Seesterneier durch Sauerstoffarmut oder Säure künstlich an der Reifung verhindert werden, so bleiben sie viel länger am Leben, als wenn sie reifen. Aber auch die Eier, in welchen Reifung schon begonnen hat oder schon fast oder gerade abgelaufen ist, scheinen durch diese Einflüsse vor einem raschen Tod bewahrt zu werden.

5. Es scheint aus diesen Tatsachen hervorzugehen, daß dem Vorgang der Eireifung und dem Vorgang der Befruchtung nicht notwendig die gleichen chemischen Prozesse zugrunde liegen. Die Befruchtung durch ein Spermatozoon oder durch chemische oder physikalische Eingriffe verlängert das Leben des Eies, während die an die Reifung des Eies sich anschließenden Vorgänge (durch Autolyse?) zum Tode des Eies führen. Es stimmt mit dem Gesagten überein, daß dieselbe Säurebehandlung, welche künstliche Parthenogenese des reifen Seesterneies veranlaßt, wenn sie beim unreifen Seesternei angewendet wird, den Reifevorgang meist hemmt.

6. Diese Tatsachen bestätigen meine früher ausgesprochene Vermutung, daß die befruchtende Wirkung des Spermatozoons darauf beruht, daß es Substanzen oder Bedingungen in das Ei führt, welche den Ablauf gewisser (synthetischer?) Vorgänge im Ei beschleunigen. Eine solche Beschleunigung könnte beispielsweise auch durch bestimmte Ionen (z. B. die Wasserstoffionen der Nukleinsäure) veranlaßt werden, allein es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß derartige katalytische Wirkungen auch durch Enzyme oder andere Stoffe oder Bedingungen hervorgerufen werden könnten. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß es uns gelungen ist, durch bestimmte Ionen unbefruchtete Eier zur Bildung normaler und entwicklungsfähiger Embryonen zu veranlassen, daß

aber die in meinem Laboratorium ausgeführten sorgfältigen Versuche von Gies, das gleiche durch Enzyme zu leisten, bisher fehl geschlagen sind.

Zum Schlusse spreche ich meinem Assistenten, Herrn Neilson, der mich in diesen Versuchen unterstützt hat, meinen besten Dank aus.

X.

Über Methoden und Fehlerquellen der Versuche über künstliche Parthenogenese[1]).

1. Auf Grund von verschiedenen Mitteilungen europäischer Autoren, welche Schwierigkeiten fanden bei der Wiederholung oder Weiterführung meiner Versuche über künstliche Parthenogenese, möchte ich einige Bemerkungen über die Methode und Fehlerquellen dieser Versuche hier mitteilen. Auf die Notwendigkeit der Sterilisation des Seewassers, der Instrumente, Hände und der Tiere selbst brauche ich wohl nicht einzugehen, sie ist selbstverständlich. Nur die größte Fehlerquelle möchte ich in diesem Zusammenhang erwähnen, nämlich die Neigung der Männchen, namentlich bei reifen Seeigeln, das Seewasser im Eimer, in dem sie in das Laboratorium gebracht werden, mit Sperm zu füllen. Es ist ratsam, die Weibchen erst 24 Stunden oder wenn möglich länger in spermfreiem Seewasser isoliert zu halten, ehe sie zu Versuchen über künstliche Parthenogenese benutzt werden. Hat man die nötigen Vorsichtsmaß-

[1]) Archiv f. Entwicklungsmech. Bd. XIII (1902), S. 481.

regeln gegen Infektion durch Sperm getroffen, so ist der nächste Schritt, die unbefruchteten Eier zur Entwicklung zu bringen. Bei den Eiern von Seeigeln ist die einzige wirksame Methode, die bis jetzt bekannt ist, dieselben für ungefähr $1^1/_2$ Stunde in Seewasser zu bringen, dessen osmotischer Druck um einen bestimmten Betrag erhöht ist. Im Prinzip ist es gleichgültig, wie diese Druckerhöhung erfolgt, durch Verdampfen von Wasser oder durch Zusatz von Salz oder Zucker oder Harnstoff zum Wasser. Für denjenigen aber, der recht viele und möglichst normale Larven erhalten will, ist die Wahl der Methoden etwas beschränkter. Ich finde nach all meinen Erfahrungen den Zusatz von Kaliumsalzen und Natriumsalzen, namentlich Kaliumchlorid und Natriumchlorid, vielleicht am günstigsten. Die Quantität der Konzentrationserhöhung ist von entscheidender Bedeutung. Wenn man die richtige Konzentration nicht genau trifft, so wird man Mißerfolge haben, und es ist erstaunlich, wie sehr die nötige Konzentration in verschiedenen Versuchsreihen schwankt. Ob die Schwankungen ausschließlich individueller Natur sind und dem verschiedenen Reifegrad der Eier entsprechen, vermag ich nicht anzugeben. Vielleicht hat auch die Temperatur einen Einfluß. Um all solchen Zufälligkeiten zu entgehen, arbeite ich stets mit einer Reihe von Lösungen. Auf diese Weise bin ich sicher, wenigstens in einer der Lösungen gute Resultate zu

erzielen. Als „stock solution" (Stammlösung) benutzte ich $2\frac{1}{2}$ n KCl-Lösung, d. h. eine Lösung, die ungefähr 186 g KCl im Liter Wasser hat. In meinen Versuchen waren die Lösungen genau titriert, aber das ist für die meisten Zwecke überflüssig. Ich nehme sechs Gefäße, jedes mit 100 ccm Seewasser, und füge diesen sechs Gefäßen der Reihe nach 8, 10, 12, 14, 16, 18 ccm der obigen $2\frac{1}{2}$ n KCl-Lösung zu. Die unbefruchteten Seeigeleier werden nun in diese sechs Gefäße (und außerdem in ein Kontrollgefäß mit reinem Seewasser) verteilt. Auch in bezug auf die Zeit, während der die Eier in diesen Lösungen verweilen müssen, bestehen Verschiedenheiten. Es ist deshalb geboten, die Eier nicht alle auf einmal, sondern in verschiedenen Intervallen herauszunehmen, etwa nach $^1/_2$, 1, $1^1/_2$ und 2 Stunden. Auf diese Weise wird man die optimale Konzentration und Versuchsdauer sicher treffen. Chlorkalium hat den Vorteil, daß es meist zur Bildung eines einzigen Embryos aus je einem Ei führt, während bei der Anwendung von Natriumchlorid Polyembryonie die Regel ist. Aber möglicherweise fällt die Skelettbildung bei der Anwendung der Natriumsalze besser aus als bei Anwendung der Kaliumsalze. Herr Hunter erlangte in Woods Holl sehr gute parthenogenetische Plutei mit Seewasser, dessen Konzentration durch Verdampfen um ca. 30—40% erhöht worden war. Wurden die Eier ca. 1—2 Stunden in solches Seewasser gebracht, so entwickelten sie sich

sehr schön, wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht wurden.

Ein zweiter wichtiger Umstand, der bei diesen Versuchen vielleicht eine Rolle spielt, ist die Temperatur. Die Versuche in Woods Holl (sowie Wilsons Versuche in Beaufort) sind alle bei Sommertemperatur angestellt und die Temperatur des Wassers war 20° C oder darüber. In Kalifornien schwankte die Temperatur in meinen Versuchen erheblich, sie war oft ziemlich niedrig und es gelang mir gelegentlich nicht, künstliche Parthenogenese herbeizuführen. Ich bezog das damals auf unvollkommene Reife der Eier. Vielleicht war das richtig und vielleicht erklärt das manche der negativen Resultate europäischer Forscher, welche im Winter arbeiteten. Allein ich habe seitdem daran gedacht, ob nicht am Ende die Temperatur in der Weise die Versuchsresultate beeinflußt, daß unterhalb einer bestimmten Temperatur die künstliche Parthenogenese nicht oder nur schwer zustande kommt. Ich werde darin bestärkt durch eine briefliche Mitteilung, die mir Herr Dongaster machte, der in Neapel gearbeitet hat, nämlich, daß er erst nur negative Resultate erhielt, daß er dann aber auf die Vermutung kam, daß die Temperatur des Wassers in Neapel zu niedrig sei und daß er die Versuche in Wasser von ungefähr 20° C anstellte. Im letzteren Falle fielen die Versuche positiv aus.

2. Das bisher Gesagte bezieht sich nur auf Versuche mit Seeigeleiern, besonders Arbacia. Ganz besondere Vorsichtsmaßregeln sind erforderlich, wenn man mit Seesterneiern arbeitet. A. Mathews hat die Beobachtung gemacht, daß man die in Seewasser zur Reife gekommenen unbefruchteten Eier von Seesternen (Asterias) dadurch zur Entwicklung bringen kann, daß man sie schüttelt und daß ein Zeitpunkt existiert, bei dem die mit dem Überbringen der Eier aus einem Gefäß in ein anderes verbundene Erschütterung ausreicht, Larven zu erzielen. Eier mit diesem Grad der Empfindlichkeit erfordern zwei Vorsichtsmaßregeln, wenn man nicht den gröbsten Täuschungen anheimfallen will. Erstens ist es nötig, die Eier in solcher Weise aus einem Gefäß in ein anderes zu bringen, daß dabei jede mechanische Erschütterung ausgeschlossen ist. Am besten erzielt man das durch Benutzung von Pipetten mit sehr weiter Öffnung zum Aufsaugen und Übertragen der Eier. Die letzteren Manipulationen müssen dann mit der größten Vorsicht geschehen. Die zweite Vorsichtsmaßregel besteht darin, daß man jedesmal, wenn man die Versuchseier aus einer Lösung in eine andere oder in Seewasser zurückbringt, auch dieselbe mechanische Manipulation in genau derselben Weise mit den Kontrolleiern vornimmt. In dieser Weise läßt es sich entscheiden, ob die parthenogenetische Entwicklung im einzelnen Falle auf mechanische Erschütterung zurückzuführen

ist oder auf andere Agentien, die man anwendet. Mit diesen Kautelen haben wir eine Reihe von Versuchen diesen Sommer an Asterias-Eiern durchgeführt und bis jetzt gefunden, daß, abgesehen von der mechanischen Erschütterung, nur zwei Methoden zur künstlichen Parthenogenese der Seesterneier führen, nämlich erstens Einbringen der Eier für 3—20 Minuten in Seewasser, dem man 3—5 ccm einer $\frac{n}{10}$ HCl- oder irgend einer anderen anorganischen Säurelösung zu je 100 ccm zufügt. Die zweite Methode, die mein Schüler Mr. A. W. Greeley fand, besteht darin, daß die Eier, nachdem sie eine bestimmte Zeit in Seewasser gelegen haben, für eine Reihe von Stunden auf Eis gebracht werden. Andere Methoden ergaben dagegen alle negative Resultate, namentlich das Erwärmen der Eier, das M. Greeley ebenfalls versuchte. Es gelang uns auch nicht durch Wasserentziehung klare Resultate zu erzielen, so daß ich vermute, daß vielleicht in meinen früheren Versuchen, bei denen ich durch Konzentrationserhöhung von Seewasser Seesterneier zur Entwicklung kommen sah, mechanische Erschütterungen die Entwicklung hervorriefen. Ich glaube auch, daß Delage durch diesen Umstand teilweise irregeführt worden ist, wenn er behauptet, daß es sich bei den Mitteln zur künstlichen Parthenogenese nur um eine „excitation banale“ handele, die sehr verschiedenartig sein könne und er gibt an, daß ungefähr jeder physikalische oder chemische Eingriff künstliche Par-

thenogenese herbeiführt. Ich glaube nicht, daß er eine solche Behauptung auf Grund von Versuchen an Seeigeleiern aufgestellt haben würde, und ich vermute, daß er auch bei Seesterneiern nur deshalb zu diesem Ausspruch geführt worden ist, weil er in Wirklichkeit, ohne sich dessen bewußt zu sein, die Eier in einem Teil seiner Versuche durch denselben Eingriff, nämlich mechanische Erschütterung, zur Entwicklung brachte. Bei Seeigeleiern wirkt die Erschütterung nicht in dieser Weise und diese Fehlerquelle, welche beim Arbeiten mit Seesterneiern so unangenehm ist, existiert hier nicht. Gleichwohl hatte ich es von vornherein mir zur Regel gemacht, die Kontrolleier auch bei Versuchen mit Seeigeleiern mechanisch stets gleich zu behandeln wie die eigentlichen Versuchseier.

3. Die für Versuche an Seesterneiern nötigen Vorsichtsmaßregeln müssen auch bei Versuchen mit den Eiern von Anneliden, Chaetopterus und Amphitrite, benutzt werden. In beiden Formen ist es uns diesen Sommer gelungen, künstliche Parthenogenese durch Schütteln und mechanische Erschütterung der Eier herbeizuführen, bei Chaetopterus ist dieses Resultat aber beschränkter und unsicherer als bei Amphitrite. Läßt man die unbefruchteten Amphitriteneier in natürlichem Seewasser liegen ohne das Gefäß zu erschüttern, so entwickeln sich die Eier ebensowenig zu Larven wie bei Seesternen. Von einer „natürlichen"

Parthenogenese dieser Formen zu schwimmenden Larven ist keine Rede. Läßt man sie aber 30 Minuten im Seewasser liegen, so können die unbefruchteten Amphitriteneier dadurch zur Entwicklung zu Larven gebracht werden, daß man sie aus einem Gefäß mittels einer Pipette in ein anderes Gefäß spritzt. Das gelingt zwar nicht bei jeder Kultur, aber doch sehr häufig. Dagegen gelingt es, die unbefruchteten Eier von Amphitrite jedesmal und ohne jede Erschütterung zur Entwicklung zu bringen, wenn man sie in Seewasser bringt, dem man eine kleine, aber bestimmte Menge eines löslichen Calciumsalzes hinzufügt. Es ist nicht nötig, die Amphitriteneier aus einer solchen Lösung in Seewasser zurückzubringen, sie entwickeln sich in einer solchen Lösung zu schwimmenden Larven. Wie also Wasserstoffionen die Larvenentwicklung von Seesterneiern herbeiführen, so führen Calciumionen die Entwicklung von Amphitriteneiern herbei. Der Zusatz von 2 bis 5 ccm einer normalen Calciumnitrat- oder Calciumchloridlösung zu 100 ccm Seewasser genügt für diesen Zweck.

Meine früheren Versuche über die spezifischen Wirkungen von Kaliumionen auf die Entwicklung unbefruchteter Chaetopterus-Eier habe ich dieses Jahr wiederholt und bestätigt gefunden. Diese Eier entwickeln sich, wenn man dem Seewasser eine kleine, aber bestimmte Menge irgend eines löslichen Kaliumsalzes (KCl, KNO_3, K_2SO_4) zufügt (ca. 1—2 ccm

einer $2\frac{1}{2}$ n-Lösung eines dieser Salze zu 100 ccm Seewasser). Es ist nicht nötig, die Eier aus dieser Lösung herauszunehmen und in normales Seewasser zurückzubringen. Es mag vielleicht besonders betont werden, daß Calcium- und Kaliumionen keine spezifische Wirkung auf die Seesterneier haben, daß Kaliumionen ebenso nicht imstande sind, die Amphitriteneier zur Entwicklung zu bringen und daß Calciumionen bei Chaetopterus-Eiern wirkungslos bleiben.

4. Indirekt sind noch folgende Tatsachen von Bedeutung für die Methode der Versuche über künstliche Parthenogenese. Alle die Ionen, welche bei Seesternen, Amphitrite und Chaetopterus Parthenogenese herbeiführen, veranlassen auch gleichzeitig Agglutination der betreffenden Eier und Bildung von Riesenembryonen. Das Problem, das Driesch sich einst vorsetzte und das bei Seeigeln auf große Schwierigkeiten stößt, nämlich den Inhalt mehrerer Eier zum Verschmelzen zu bringen, gelingt in diesen Versuchen spielend und im großartigsten Maßstabe, ganz besonders bei den Eiern von Seesternen. Ich brauche kaum zu betonen, daß es von großer theoretischer Bedeutung ist, daß die Ionen, welche künstliche Parthenogenese herbeiführen, auch gleichzeitig den physikalischen Zustand der Eier in bestimmtem Sinne ändern. Es ist mir noch nicht gelungen, ein spezifisches Ion zu finden, daß die

unbefruchteten Eier von Seeigeln zur Entwicklung bringt. Es wäre von Interesse festzustellen, ob ein solches Ion, wenn es gefunden wird, ebenfalls eine Agglutination der Seeigeleier veranlaßt.

An anderen Formen, Nereis, Podarke, Phascolosoma, sind die Versuche soweit geführt, daß wir behaupten können, künstliche Parthenogenese (schwimmende Larven) ist bei denselben möglich. Die Versuche sind aber nicht allseitig genug durchgearbeitet, um veröffentlicht werden zu können. Von den hier mitgeteilten Methoden können wir mit Bestimmtheit behaupten, daß sie an den amerikanischen Formen des atlantischen Ozeans zum Ziele führen. Für die Auffindung weiterer Methoden dürfte es sich vielleicht empfehlen, folgende (theoretische) Gesichtspunkte im Auge zu behalten, die ich in verschiedenen früheren Arbeiten ausführlicher besprochen habe. Die betreffenden künstlichen Eingriffe zur Erzielung von Parthenogenese müssen darauf hinauslaufen, daß sie erstens die Verflüssigung oder sonstige Zerstörung der Kernmembran begünstigen; daß sie zweitens auch die physikalishen Eigenschaften des Protoplasmas (Viscosität usw.) in bestimmtem Sinne ändern. Es scheint, daß in den Eiern, an denen bis jetzt die künstliche Parthenogenese gelungen ist (und vermutlich an vielen, wenn nicht allen sonstigen Eiern), unter natürlichen Umständen im unbefruchteten Ei solche chemische Vorgänge ablaufen, die das Ei im Sinne der zwei erwähnten Bedingungen zu verändern streben,

daß diese aber unter gewöhnlichen Umständen so langsam ablaufen, daß das Ei abstirbt, ehe es zur wirklichen Zellteilung kommt. Solche Umstände, welche den Ablauf dieser natürlichen Prozesse zu beschleunigen imstande sind, werden auch das unbefruchtete Ei zur Entwicklung veranlassen.

XI.

Weitere Versuche über künstliche Parthenogenese[1].

Vorläufige Mitteilung von Jaques Loeb, Martin Fischer und Hugh Neilson.

(From the Hull physiological Laboratory of the University of Chicago.)

In einer Reihe von früheren Arbeiten hat Loeb gezeigt, daß die unbefruchteten Eier verschiedener Seeigelarten sich bei geeigneter Temperatur zu normalen Larven zu entwickeln imstande sind, wenn man sie für eine bestimmte Zeit (ca. $1^1/_2$—2 Stunden) in Seewasser bringt, dessen osmotischer Druck um eine bestimmte Größe (30—60%) erhöht worden ist. In Lösungen von zu geringer oder zu hoher Konzentration oder bei zu kurzem oder zu langem Verweilen in der hypertonischen Lösung werden nur die Anfangsstadien der Furchung erreicht. Da es gleichgültig ist, auf welche Weise der osmotische Druck des Seewassers in diesen Versuchen erhöht wird, so ist der entscheidende Umstand für die Entwicklung des unbefruchteten Eies ein bestimmter Wasserverlust von

[1]) Pflügers Archiv. Bd. 87 (1901), S. 594.

seiten des Eies. Diese Versuche sind seitdem von einer Reihe von erfahrenen Autoren, u. a. E. B. Wilson und Curt Herbst, wiederholt und bestätigt worden.

Bei Anneliden hat Loeb im vorigen Jahre den Nachweis geführt, daß die Entwicklung unbefruchteter Eier von Chaetopterus dadurch hervorgerufen werden kann, daß man dem Seewasser eine kleine Menge eines Kaliumsalzes hinzufügt. Fügt man 1—2 ccm einer $2\frac{1}{2}$ n KCl-(oder KNO_3-)Lösung zu 100 ccm Seewasser, so bilden sich schwimmende, anscheinend normale Larven aus den unbefruchteten Eiern, wenn man die letzteren dauernd oder nur kurze Zeit (mehr als drei Minuten) in dieser Lösung läßt. Eine solche Lösung hat keine Wirkung auf unbefruchtete Seeigeleier. Ferner sind Kaliumionen anscheinend die einzigen Ionen, welche eine derartige Wirkung auf unbefruchtete Chaetopteruseier haben (mit Ausnahme vielleicht von Wasserstoffionen).

Loeb und Neilson gelang es diesen Sommer, künstliche Parthenogenese bei einem Seestern (Asterias) vermittels spezifischer Ionen hervorzurufen, nämlich Wasserstoffionen. Setzt man zu 100 ccm Seewasser 3—5 ccm einer $\frac{n}{10}$ unorganischen Säure zu, so entwickeln sich die unbefruchteten Seesterneier zu Gastrulae, wenn man sie einer solchen Lösung 3 bis 20 Minuten aussetzt und dann in normales Seewasser zurückbringt. Weder durch Kalium- noch durch eines der übrigen von uns versuchten Ionen konnte eine

derartige Wirkung hervorgebracht werden. Bei Versuchen mit Seesterneiern sind ganz besondere Vorsichtsmaßregeln nötig. A. Mathews hat nämlich gefunden, daß, wenn unbefruchtete Seesterneier in einem bestimmten Stadium der Reife geschüttelt werden, sie sich zu Larven zu entwickeln imstande sind. Es wurde in unseren Versuchen sorgfältigst darauf geachtet, daß bei der Handhabung der Eier und der Übertragung derselben von einer Lösung in eine andere jede Erschütterung vermieden wurde. Jeder Versuch wurde von einem Kontrollversuch mit demselben Material begleitet, das mechanisch genau ebenso behandelt wurde wie die Säureeier.

Während sich bei genügender Vorsicht im Kontrollmateriale kein Ei entwickelte, bildeten sich die Larven in den mit Säure behandelten Eiern in großer Zahl. Bis zu 20% der Eier konnten im schwimmenden Zustand gefunden werden. Daß Wasserstoffionen keinen derartigen Einfluß auf Seeigeleier haben, hat Loeb schon früher nachgewiesen.

Loeb und Fischer haben diesen Sommer künstliche Parthenogenese bei einem anderen marinen Ringelwurm, nämlich Amphitrite, hervorgerufen. Bei Versuchen mit Amphritite sind ähnliche Vorsichtsmaßregeln erforderlich wie bei den Versuchen mit Eiern von Seesternen. Es gelang uns nämlich, unbefruchtete Amphitriteneier durch Übertragen von einem Gefäß mit Seewasser in ein anderes zur Entwicklung zu

bringen. Es scheint aber, daß das nur dann möglich ist, wenn die Eier eine Zeitlang in Seewasser gelegen haben, und auch dann kann man nicht mit Sicherheit auf Erfolg bei diesem Versuch rechnen. Dagegen ist es mit voller Sicherheit möglich, unter allen Umständen aus den unbefruchteten Amphitriteneiern schwimmende Larven zu züchten, wenn man dem Seewasser eine kleine, aber bestimmte Menge Kalzium zufügt. Kalium, das mit der größten Sicherheit künstliche Parthenogenese bei Chaetopterus hervorruft, versagt für diesen Zweck bei Amphitrite. Mg, Sr, Li und Na erwiesen sich ebenfalls als wirkungslos bei Amphitrite. Bei Wasserstoffionen haben wir keine ausreichenden Versuchsreihen angestellt. Während in dem Seewasser, dessen Kalziumgehalt um einen bestimmten Betrag erhöht war, sich mehr als 50% der Eier von Amphitrite in schwimmende Larven umwandelten, entwickelte sich kein einziges Ei im Kontrollmaterial, das, vom Kalziumzusatz abgesehen, in allen Stücken gleich behandelt worden war. Es gelang uns nicht, durch Wasserentziehung die unbefruchteten Eier von Amphitrite zur Entwicklung zu bringen. Ferner gelang es uns, künstliche Parthenogenese (segmentierte Larven!) bei Nereïs limbata herbeizuführen, und Mr. Greeley hat unbefruchtete Eier von Podarke soweit zur künstlichen Entwicklung gebracht, daß nächstes Jahr wohl auch diese Versuche zum Abschluß gebracht werden können. Wir können also

sagen, daß bisher die unbefruchteten Eier einer jeden Form unter den Echinodermen und Anneliden (und auch anderer Formen, wie Phascolosoma), die uns in die Hände gefallen sind, durch künstliche Mittel zur Bildung von Larven veranlaßt werden konnten. In bezug auf die theoretische Seite dieser Erscheinungen hat sich weiter die Anschauung bestätigt, welche Loeb in seinen früheren Arbeiten über diesen Gegenstand ausgesprochen hat, nämlich daß das Ei vieler (vielleicht aller) Tiere eine gewisse Tendenz haben, sich parthenogenetisch zu entwickeln, daß aber unter normalen Bedingungen dieser Prozeß der Entwicklung bei der Mehrzahl der Tiere so langsam abläuft, daß das Ei abstirbt, ehe es ihm möglich ist, ein vorgeschrittenes Furchungs- oder das Larvenstadium zu erreichen. Die verschiedenen Mittel, durch die wir künstliche Parthenogenese herbeiführen, haben alle das gemeinsam, daß sie den parthenogenetischen Vorgang der Entwicklung beschleunigen. Das läßt sich direkt beobachten, wie Loeb bereits früher gezeigt hat, und wie in unserer ausführlichen Arbeit weiter dargetan werden soll.

XII.

Künstliche Parthenogenesis bei Mollusken [1]).

Nach der Entdeckung der Tatsache, daß unbefruchtete Eier des Seeigels ohne Sperma-Zutritt nur durch Wasserentziehung zur Entwicklung gebracht werden können, lag die Frage nahe, ob die künstliche Parthenogenese auf wenige Spezies beschränkt oder eine ebenso allgemeine Erscheinung wie die sexuelle Fortpflanzung ist. Letzteres wäre nach zwei Richtungen von Wichtigkeit. Es würde danach möglich erscheinen, anzunehmen, daß die künstlichen physikalischen oder chemischen Mittel, durch welche die unbefruchteten Eier zur Entwicklung gebracht werden, irgend etwas gemeinsames mit den Mitteln aufwiesen, durch die das Sperma die Entwicklung anregt. So könnten die Versuche über künstliche Parthenogenese den Weg für die Lösung des Problems der Befruchtung zeigen. Wenn es möglich wäre, jemals eine positive Meinung über Abiogenese zu gewinnen, so dürften ferner die Versuche der künstlichen Parthenogenese an diesem Problem mithelfen.

---

[1]) University of California Publications Physiology. Vol. I. Nr. 3. 3. Aug. 1903.

In der Tat kann man nicht erwarten, daß die Eier einer jeden der zahlreichen Tierformen in bezug auf die Möglichkeit künstlicher Parthenogenese geprüft werden können. Wenn nun gezeigt werden kann, daß die Eier einer jeden Form, an welcher bis jetzt experimentiert wurde, imstande sind, sich ohne Sperma durch physikalische oder chemische Anregungsmittel zu entwickeln, so darf man mit einiger Wahrscheinlichkeit daraus schließen, daß die Eier anderer Tiergruppen, wenn sie auch noch nicht untersucht worden sind, sich in gleicher Weise verhalten, wenn auch die technischen Schwierigkeiten bei der einen Form größer sein mögen, als bei der anderen. Die bis jetzt untersuchten Formen gehören alle zu zwei Gruppen, die der Echinodermen und die der Anneliden. Keine Spezies dieser beiden Gruppen, deren Eier auf künstliche Parthenogenese geprüft wurden, hat ein negatives Ergebnis gezeigt. Ich hatte lange die Absicht zu sehen, ob nicht die unbefruchteten Eier von Mollusken durch physikalisch-chemische Mittel zur Entwicklung gebracht werden können, aber in Woods Hole waren keine Formen mit getrennten Geschlechtern zu erhalten. Mittlerweile berichtete Ariola aus Neapel, daß er in Neapel vergebens versucht habe an einem Mollusk, Dentalium entale, künstliche Parthenogenese[1]) zu erzielen. Hierzu ist zu bemerken, daß durch einen

[1]) Ariola. Mitteil. a. d. Zoologischen Station zu Neapel. Vol. XV. S. 408. 1902.

Fehler seinerseits nicht die richtige Lösung verwendet wurde, und deshalb auch die Versuche ohne Erfolg bleiben mußten. Professor Kostanecki[1]) veröffentlichte neuerdings in einer kurzen Notiz die Tatsache, daß es ihm gelungen sei, bei einem Mollusk — Mactra — durch die von mir an Seeigeln angewandte Methode die ersten Furchungen zu erzielen. Daß es ihm dabei nicht glückte, die Eier bis zum Larvenstadium zu bringen, schrieb er dem Umstand zu, daß er möglicherweise die für diese Form geeignetste Konzentration nicht zur Anwendung gebracht habe. Ich hatte kürzlich Gelegenheit, einige Experimente an Schnecken von Pacific Grove, Lottia gigantea (owl-limpet) und an drei anderen Schnecken der Spezies Acmaea vorzunehmen. In jeder dieser Formen gelang es mir aus den unbefruchteten Eiern schwimmende Larven zu erzielen, nachdem die Eier zwei Stunden lang einem Seewasser ausgesetzt waren, dessen Konzentration durch Hinzufügen von KCl oder NaCl erhöht war[2]). Bei Lottia mußte ich 15—20 ccm einer $2\frac{1}{2}$ m-Lösung von KCl zu 100 ccm Seewasser hinzufügen; bei einer anderen Schnecke brauchte ich nur 10 ccm der $2\frac{1}{2}$ m KCl-Lösung zu 100 ccm Seewasser beizufügen. Das Optimum der Konzentration ist also für jede Art etwas verschieden.

[1]) Kostanecki, Bullet. Ac. Sci. Krakau 1902.

[2]) KCl gab bessere Resultate oder wenigstens mehr Embryonen als NaCl.

Die Temperatur während dieser Versuche wechselte zwischen 15 und 19° C.

Zwei bis drei Stunden, nachdem die Eier aus den hypertonischen Lösungen herausgenommen und in normales Seewasser überführt waren, begann die Furchung ganz regelmäßig, wenigstens im Zwei- und Vierzellen-Stadium. Für das Achtzell-Stadium erhielt ich keine genügenden Beobachtungen. Nach 20 bis 24 Stunden fand ich schwimmende Larven, die meist innerhalb 48 Stunden starben. Bei einer Spezies (Acmaea?) allein fand ich Larven, die Neigung zeigten länger zu leben. Der Tod wurde verursacht oder doch begleitet durch die Tendenz der Zellen auseinander zu fallen und sich aufzulösen. In anderen Kulturen wurde eine verhältnismäßig große Zahl von Teil-Larven gefunden. Die Ursache dieses Verfalls konnte ich nicht feststellen. Wahrscheinlich hatten die Eier zur Zeit meiner Versuche die volle Reife noch nicht erreicht. Ich bin geneigt dies aus der Tatsache zu schließen, daß ich eine Befruchtung der Eier von Lottia (mit der die meisten Versuche gemacht wurden) mit Sperma ihrer eigenen oder einer fremden Spezies nicht erreichte. Es ist vielleicht hier die Bemerkung am Platze, daß die Eier, welche mit Sperma nicht befruchtet werden konnten, durch physikalische Wirkung, wie die Wasserentziehung aus dem Ei, zur Entwicklung zu bringen waren. Dieses refraktäre Verhalten der Eier gegenüber Sperma war

bei diesen Versuchen in der Hinsicht willkommen, daß es das Gefühl der Sicherheit erhöhte, daß die Vorsichtsmaßregeln[1]) gegen eine Verunreinigung der Eier mit Sperma ausreichend waren. Bei den Kontrollversuchen wurden weder gefurchte Eier noch schwimmende Larven gefunden. Behandlung der Eier mit Säure brachte nur den Anfang der Furchung hervor. Mechanische Bewegung, soweit versucht, hatte keine Wirkung.

Ich kann somit auf Grund dieser Experimente feststellen, daß die Mollusken der Liste derjenigen Tiere beigezählt werden dürfen, bei denen es möglich ist, durch physikalisch-chemische Mittel unbefruchtete Eier zu schwimmenden Larven zu entwickeln. Die Versuche sollen fortgesetzt werden.

[1]) Diese Vorsichtsmaßregeln waren den früher erwähnten gleich. Bei der glatten Oberfläche an Schale und Fuß des Tieres ist es leicht, dasselbe mit frischem Wasser gründlich vor Öffnung des Eierstockes zu reinigen.

XIII.

Über Befruchtung, künstliche Parthenogenese und Cytolyse des Seeigeleis[1]).

I.

In meinen früheren Mitteilungen über die künstliche Parthenogenese habe ich die Bedeutung derselben für die Analyse des natürlichen Befruchtungsvorganges wenig berücksichtigt. Es kam mir in erster Linie darauf an, mich davon zu überzeugen, daß es allgemein möglich ist, durch bestimmte physikalisch-chemische Mittel das unbefruchtete Ei zu zwingen, sich zu einer Larve zu entwickeln. Die Frage, ob der Eintritt des Spermatozoons in das Ei ähnliche Änderungen in demselben hervorruft wie diejenigen, welche durch die spezifischen Mittel zur künstlichen Parthenogenese in demselben eintreten, blieb zunächst unberücksichtigt. Es sind aber allmählich so viele Erfahrungen über die künstliche Parthenogenese gesammelt worden, daß die Frage nach dem Zusammenhang der künstlichen Parthenogenese und der Samenbefruchtung in Angriff genommen werden darf.

[1]) Archiv für die ges. Physiologie, Bd. 103, 1904.

Ich habe schon früher darauf hingewiesen, daß die Eier verschiedener Tierformen einen verschiedenen Grad der Tendenz zur Parthenogenese zeigen. Die Eier der Seesterne sind imstande, wie ich schon voriges Jahr für Asterias mitteilte[1]), und wie ich in diesem Jahr auch für Asterina festgestellt habe, sich ohne jeden nachweisbaren äußeren Eingriff zu normalen Larven zu entwickeln. Durch künstliche Eingriffe vermehren wir nur die Zahl der Eier, welche sich parthenogenetisch zu entwickeln imstande sind. Die Eier der Seeigel dagegen besitzen, wie die am Stillen Ozean, am Atlantischen Ozean und in Neapel ausgeführten Versuche beweisen, nur eine geringe Tendenz zur parthenogenetischen Entwicklung; man sieht hier niemals, daß ein Ei ohne bestimmte äußere Eingriffe sich zu entwickeln vermag.

Die Mittel nun, durch welche die Seeigeleier gezwungen werden können, sich zu Larven zu entwickeln, sind sehr eng begrenzt, und ich habe bisher nur ein einziges gefunden, das zu Resultaten führt, nämlich die Erhöhung des osmotischen Druckes der umgebenden Lösung. Es ist am einfachsten, die Konzentration relativ hoch zu wählen und die Eier nur für beschränkte Zeit in der Lösung zu lassen. Bringt man sie dann in normales Seewasser zurück, so fangen sie an, sich zu entwickeln. Bei richtiger Wahl der osmotischen Druckerhöhung und bei passend ge-

[1]) Pflügers Archiv, Bd. 99, S. 323, 1903.

wählter Expositionsdauer entwickeln sich in dem Falle die meisten Eier zu Larven.

Ich habe mich ferner durch Versuche überzeugt, daß die Übertragung der Eier aus der hypertonischen Lösung in normales Seewasser nur dann nötig ist, wenn die Konzentrationserhöhung des Seewassers beträchtlich ist.

Wie ich früher gefunden hatte[1]), und wie ja selbstverständlich ist, wirkt eine Erhöhung der Konzentration des Seewassers über eine gewisse Grenze hemmend auf die Furchung und Entwicklung des Seeigeleies. Man kann aber durch vorsichtiges Probieren eine Konzentrationserhöhung finden, die nicht hoch genug ist, um die Entwicklung des Eies in den ersten 24 Stunden zu unterdrücken, und die doch ausreicht, um wenigstens bei einem kleinen Prozentsatz der Eier künstliche Parthenogenese hervorzurufen. In solchen hypertonischen Lösungen habe ich unbefruchtete Seeigeleier sich zu schwimmenden Blastulis entwickeln sehen, ohne daß es nötig gewesen wäre, die Eier aus der Lösung herauszunehmen und in normales Seewasser zurückzubringen[2]). Diese Tatsache ist von theoretischer Bedeutung, weil sie beweist, daß die Wasserabgabe von seiten des Eies von größerer Bedeutung ist für die künstliche Parthenogenese als

[1]) Journ. of Morphology, vol. 7, S. 253. 1892.

[2]) American Journal of Physiology, vol. 4, S. 178. 1900.

das Eindringen von Wasser, wenn das Ei in das normale Seewasser zurückgebracht wird.

Daß dieser Schluß richtig ist, wird dann weiter dadurch bewiesen, daß es nicht gelingt, eine parthenogenetische Entwicklung oder Furchung dadurch hervorzurufen, daß man unbefruchtete Eier aus normalem Seewasser in verdünntes Seewasser bringt und sie hier dauernd oder vorübergehend läßt. Ich habe viele derartige Versuche angestellt, und alle fielen absolut negativ aus. Wenn das Eindringen von Wasser in das unbefruchtete Ei der wesentliche Umstand wäre, der die Entwicklung bei der künstlichen Parthenogenese hervorruft, so müßte es gelingen, wenigstens einen Anfang der Entwicklung zu beobachten, wenn man Eier aus normalem in verdünntes Seewasser bringt, was aber, wie gesagt, nicht der Fall ist.

Wir kommen also zu dem Schluß, daß die Wasserabgabe von seiten des Eies der wesentliche Umstand bei der künstlichen Parthenogenese ist, welche durch Konzentrationserhöhung des Seewassers hervorgerufen wird.

Ich habe bis jetzt kein anderes Mittel gefunden, durch welches es gelingt, schwimmende Larven aus Seeigeleiern zu gewinnen. Wenn man die Eier dauernd in alkalisches Seewasser bringt, so fangen sie an, sich zu furchen, aber die Eier entwickeln sich nie zu Larven, auch wenn man sie nachher in nor-

males Seewasser zurückbringt. Ebenso kann man Ansätze zur Entwicklung, d. h. die ersten Furchungsvorgänge, beobachten, wenn man die Eier vorübergehend in schwachsaures Seewasser bringt. Die Angabe anderer Autoren, daß sie gelegentlich Larven mit Säure hervorgebracht haben, haben mich nie überzeugt, und ich kann mich des Verdachtes nicht erwehren, daß die betreffenden Autoren parasitische Organismen, die sich in den Seeigeln finden, und die aus dem Zirkulationssystem oder aus dem Darm in die Eikulturen gerieten, für Seeigellarven gehalten haben.

Die Möglichkeit, durch Wasserentziehung unbefruchtete Eier zur Entwicklung zu bringen, scheint ziemlich allgemein verbreitet zu sein. Im letzten Jahre gelang es mir, auf diese Weise aus den unbefruchteten Eiern verschiedener Mollusken (Lottia gigantea und verschiedener Arten von Acmaea) schwimmende Larven hervorzubringen[1]), nachdem Kostanecki[2]) schon vorher gezeigt hatte, daß bei Mactra auf diesem Wege die ersten Forschungen hervorgerufen werden können.

Bei Anneliden hat Bullot künstliche Parthenogenese durch vorübergehende Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers bei Ophelia hervor-

---

[1]) University of California Publications, Physiology, vol. 1. 1903.

[2]) Bulletin de l'Acad. des Sciences, Krakau. 1902.

gerufen[1]). Bei Wirbeltieren hat Bataillon eine Reihe von Furchungsvorgängen im unbefruchteten Ei von Fröschen und Petromyzon auf demselben Wege erzwungen[2]).

Es ist aber zu beachten, daß, obwohl die osmotische Methode bei manchen Formen die einzige und bei vielen die beste ist, durch welche künstliche Parthenogenese erzielt werden kann, es dennoch bei gewissen Formen andere wirksame Methoden der Parthenogenese gibt. Es unterliegt keinem Zweifel, daß Zusatz einer kleinen Quantität eines beliebigen Kaliumsalzes zum Seewasser die Eier von Chaetopterus zur Entwicklung bringt[3]). Aber in diesem Falle ist die Entwicklung der Larven eine abnorme; die Eier entwickeln sich ohne Zellteilung in schwimmende Larven. Ich hatte das schon beobachtet, und Frank Lillie hat das durch cytologische Untersuchung der Eier über jeden Zweifel erhoben[4]). Bei den Seesterneiern führt vorübergehender Zusatz von etwas Säure zum Seewasser dazu, die Zahl der sich parthenogenetisch entwickelnden Eier zu vermehren[5]).

[1]) Bullot, Arch. f. Entwicklungsmech., Bd. 18, S. 161. 1904.
[2]) Bataillon, Archiv für Entwicklungsmechanik, Bd. 18. 1904.
[3]) Loeb, American Journal of Physiology, vol. 4, S. 423. 1901.
[4]) F. Lillie, Arch. f. Entwicklungsmech., Bd. 14, S. 477. 1902.
[5]) Ich möchte Delage gegenüber daran festhalten, daß jede beliebige organische wie anorganische Säure diese Wirkung hat, und daß die von ihm beobachtete Wirkung der Kohlensäure nur ein spezieller Fall der allgemeinen Säurewirkung ist.

Aber die Entwicklung erfolgt hier durch Kern- oder Zellteilung, wenn auch gelegentlich die Zellteilung hinter der Kernteilung eine Zeitlang zurückbleiben mag[1]).

Während also die osmotische Druckerhöhung des Seewassers nicht die einzige Methode ist, durch welche unbefruchtete Eier zur Entwicklung von Larven veranlaßt werden können, so ist sie doch die allgemeinste. Es scheint ferner, daß die durch Konzentrationserhöhung veranlaßte Entwicklung der unbefruchteten Eier mehr derjenigen gleicht, welche durch das Eindringen von Spermatozoen veranlaßt ist. Das legt den Gedanken nahe, daß eine weitere Analyse des Vorganges der osmotischen Befruchtung vielleicht eine weitere Übereinstimmung mit den bei der normalen Befruchtung zu beobachtenden Vorgängen ergeben wird. Dieser Gedanke gab die Veranlassung zu den im folgenden mitzuteilenden Versuchen.

II.

Die Befruchtung des Seeigeleies durch ein Spermatozoon ist dadurch charakterisiert, daß das Ei eine Befruchtungsmembran bildet. Bei der durch Kon-

[1]) Es ist durchaus irrig, zu behaupten, daß jeder Eingriff die Seesterneier zur parthenogenetischen Furchung veranlaßt. Dieser Irrtum ist dadurch veranlaßt, daß ein gewisser Prozentsatz der Eier, falls sie reif sind, sich ohne äußeren Eingriff entwickeln kann, was bisher ziemlich allgemein übersehen worden ist.

zentrationserhöhung des Seewassers veranlaßten parthenogenetischen Entwicklung desselben Eies tritt keine Membranbildung ein. Dieser Unterschied ist so charakteristisch, daß er zur Meinung führen könnte, daß der Vorgang der osmotischen Befruchtung nur wenig mit dem Vorgang der Samenbefruchtung gemein habe.

Ich habe den Vorgang der Membranbildung beim Seeigelei nach dem Eindringen des Spermatozoons näher untersucht. Unter gewöhnlichen Umständen geht der Vorgang plötzlich vor sich. Nach ein bis drei Minuten nach dem Zufügen des Samens zu den Eiern sieht man jedes Ei plötzlich mit einer Membran umgeben. Wie der Prozeß der Membranbildung vor sich geht, und was die Membran ist, läßt sich in solchen Fällen nur erraten. Ich habe aber gefunden, daß Eier von Strongylocentrotus, welche in Seewasser 24 Stunden lang vor der Befruchtung gelegen hatten, die Membran langsamer bilden, so daß man hier den Mechanismus des Vorgangs verfolgen kann. Bei solchen Eiern springt häufig die Membran nicht allseitig hervor, sondern man sieht, daß nach dem Zusatz des Samens an der Oberfläche der Eier sich Blasen bilden, die nachher verschmelzen und dann die normale Befruchtungsmembran bilden. Die Blasenbildung besteht aber in dem Auspressen (oder der Sekretion unter Druck?) von wässeriger Flüssigkeit durch das Protoplasma, wodurch die feste Ober-

flächenlamelle, womit das Ei umgeben ist, an der betreffenden Stelle in die Höhe gehoben wird. Indem eine solche Sekretion an der ganzen Oberfläche stattfindet oder die Menge der ausgeschiedenen Flüssigkeit zunimmt, wird schließlich die feste Oberflächenlamelle überall von dem Protoplasma des Eies abgehoben und bleibt von letzterem durch eine relativ dicke Flüssigkeitsschicht getrennt. Unter normalen Umständen erfolgt die Sekretion dieser Flüssigkeit stürmisch genug, um die Oberflächenlamelle gleichzeitig überall vom Ei abzuheben.

Der Umstand, daß die Flüssigkeit unter Druck abgeschieden wird, bedingt die runde, meist genau kegelförmige Oberfläche der Membran. Eine der wesentlichen Wirkungen der Samenbefruchtung besteht also in dem Auspressen von Flüssigkeit aus dem Ei.

Das ist aber vielleicht nur eine Phase des Vorganges. Ich habe schon vor zehn Jahren die Tatsache mitgeteilt, daß eine Wirkung des Eintritts des Spermatozoons in das Seeigelei in einer Erhöhung der Quellungsfähigkeit des letzteren besteht. Damals schrieb ich diesen Vorgang einer osmotischen Druckzunahme im Ei infolge des Sameneintrittes zu und versuchte den Vorgang der Eibefruchtung mit dem der Muskelreizung in Parallele zu setzen, da der letztere ja auch eine Wasseraufnahme von seiten des

Muskels zur Folge hat[1]). Aber ich bin zu der Ansicht gekommen, daß die Wasseraufnahme und Wasserabgabe in tierischen Organen nicht ausschließlich durch osmotische Kräfte bedingt ist. Was nun aber auch die Kräfte sein mögen, welche den Flüssigkeitsaustausch der Gewebe bedingen, es ist möglich, daß bei der Befruchtung eine Flüssigkeitsaufnahme durch das Ei stattfindet und sicher, daß unmittelbar darauf ein Auspressen von Flüssigkeit von seiten des Eies erfolgt.

Man muß nun berücksichtigen, daß der Vorgang der Samenbefruchtung sehr rasch verläuft, während die Einleitung der künstlichen Parthenogenese ein sehr langsamer Vorgang ist. Der ganze Charakter der Membranbildung ist nur verständlich, wenn plötzlich eine sehr ausgiebige Sekretion von Wasser an der Grenze von Protoplasma und Oberflächenhaut des letzteren stattfindet. Bei den gewöhnlichen Versuchen über die künstliche Parthenogenese der Seeigeleier wird der osmotische Druck des Seewassers nur um etwa 30—50% erhöht. Es war deshalb zu vermuten, daß bei höherem osmotischen Druck auch die Ände-

[1]) Loeb, Pflügers Archiv, Band 55, S. 525, 1894, sowie Woods Holl Lectures, delivered 1893. Boston, Ginn & Co., 1894. Schücking, der neuerdings ebenfalls Beobachtungen über die Wasseraufnahme des Eies unmittelbar nach der Befruchtung mitgeteilt hat, scheint meine Arbeiten über den Gegenstand übersehen zu haben. Schücking, Pflügers Archiv, Bd. 97, S. 58. 1903.

rungen im Ei stürmischer verlaufen würden, und daß es unter diesen Umständen auch vielleicht zur Membranbildung beim unbefruchteten Ei kommen würde. Diese Vermutung bestätigte sich.

Die Versuche wurden in konzentrierten Lösungen von Salzen und von Rohrzucker angestellt.

Bringt man unbefruchtete Eier von Strongylocentrotus purpuratus in eine 2½ bis 1½ n-Kochsalzlösung, so tritt in kurzer Zeit eine Membranbildung ein, der häufig, aber nicht immer eine Cytolyse des Eies folgt. Die Membranbildung erfolgt in derselben Weise wie bei der Befruchtung. Manchmal erfolgt die Flüssigkeitssekretion ganz gleichmäßig an der gesamten Oberfläche des Eiprotoplasmas zwischen diesem und der Oberflächenlamelle, welche das unbefruchtete Ei umgibt. In dem Falle wird die Membran allseitig plötzlich abgehoben, wie bei der normalen Befruchtung. Manchmal aber sieht man auch hier den Vorgang der Membranbildung in Etappen vor sich gehen, d. h. an einzelnen Stellen der Oberfläche erfolgt eine Sekretion, wodurch an dieser Stelle die Oberflächenlamelle in der Form einer kleinen Blase abgehoben wird; dann findet der Vorgang an anderen Stellen statt, bis schließlich die Oberflächenlamelle überall abgehoben ist und die runde, homogene, charakteristische Befruchtungsmembran gebildet ist. Meist aber bleibt der Prozeß hierbei nicht stehen, sondern es erfolgt nach der Membranbildung ein Cytolyse

des Eies, d. h. das Ei verliert sein Pigment und seine Struktur und wird in einen blassen Schatten verwandelt. Dabei nimmt es stark an Volumen zu.

Dieselben Wirkungen übt auch eine konzentrierte Rohrzuckerlösung aus. In 2½ N und 2 N Rohrzuckerlösungen treten dieselben Erscheinungen ein.

Es ist kaum nötig, zu bemerken, daß die Bedingungen für diesen Versuch sich in der verschiedensten Weise variieren lassen. Je nach der Konzentration der Lösung verlaufen die Erscheinungen mehr oder weniger stürmisch. Auch mit der Natur der Lösungen ändert sich die Erscheinung. Da ich aber den Einfluß der chemischen Natur der Substanz auf die Cytolyse einer systematischen Untersuchung zu unterziehen beabsichtige, so will ich hierauf an dieser Stelle nicht näher eingehen.

Der Prozeß der Membranbildung in den konzentrierten Lösungen verläuft in zwei Phasen. Zuerst tritt ein Schrumpfen des Eies ein, zweifellos eine Folge des Wasserverlustes; dann folgt ein mehr oder weniger deutliches Schwellen des vorher geschrumpften Eies. Daß dieses Schwellen aber ausnahmslos erfolgt, vermag ich nicht mit Bestimmtheit zu behaupten. Nach Ablauf des Schrumpfens und nach dem Beginn des Schwellens tritt die Membranbildung ein. Es sieht aus, als suche das Ei sich des bei der Schwellung eintretenden Wassers durch Sekretion zu entledigen.

Nach der Bildung der Membran folgt fast ausnahmslos, manchmal unmittelbar, oft nach einem längeren Intervall die Cytolyse des Protoplasmas des Eis. Dieser Vorgang erfolgt meist, wenn nicht immer, mit einer sehr großen Volumzunahme des Eies.

Es ist eine auffallende Erscheinung, daß in diesen Versuchen die Cytolyse meist bei solchen Eiern erfolgt, die eine Membran gebildet haben. Das veranlaßte mich, zu untersuchen, ob befruchtete Eier — welche unter dem Einfluß des Spermatozoons eine Membran gebildet haben — nicht rascher und in größerer Zahl der Cytolyse unterliegen als die unbefruchteten Eier. Das ist in der Tat der Fall. Um das zu zeigen, kann man sogar Lösungen benutzen, welche mit dem Seewasser nahezu oder völlig isotonisch sind. Bringt man beispielsweise frisch befruchtete Seeigeleier in ein $\frac{5}{8}$ M Lösung von Na_2SO_4, so wird man nach $1^1/_2$ Stunden eine große Zahl, vielleicht die Hälfte aller Eier cytolisiert finden. Bringt man unbefruchtete Eier in dieselbe Lösung, so tritt selbst in viel längerer Zeit (24 Stunden) nur bei einem sehr kleinen Prozentsatz der Eier Cytolyse ein.

Es wird vielleicht manchem paradox erscheinen, daß die Eier in einer 2 M Lösung eines Salzes oder von Rohrzucker nach anfänglichem Schrumpfen alsbald anfangen, zu quellen. Dieses paradoxe Verhalten scheint aber sehr verbreitet zu sein. Ich habe vor fünf Jahren gefunden, daß, wenn man Frosch-

muskeln in hypertonische Kochsalzlösungen bringt, der Muskel erst an Gewicht verliert, dann aber zunimmt; und zwar wächst diese Zunahme innerhalb gewisser Grenzen mit der Konzentration der Kochsalzlösung. Während der Froschmuskel beispielsweise in einer 1,05 prozentigen Kochsalzlösung in 24 Stunden nur um 0,7 % seines anfänglichen Gewichtes zunahm, nahm er in einer 1,75 prozentigen Lösung um 13 % seines Gewichts zu und in einer 2,8 prozentigen Kochsalzlösung um 23,8 %[1]).

Auch bei Infusorien findet man nach anfänglichem Schrumpfen eine Quellung, wenn sie in hypertonische Lösungen von gewisser Konzentration gebracht werden. Dabei zeigt sich bei manchen Formen eine Vergrößerung der Vakuolen und eine Bildung von wasserhaltigen Blasen unter der Oberflächenlamelle[2]), die möglicherweise der hier beschriebenen Bildung der Befruchtungsmembran vergleichbar ist.

Welche Umstände es bewirken, daß in einer hypertonischen Lösung dem anfänglichen Schrumpfen der Gewebe eine manchmal beträchtliche Wasseraufnahme folgt, vermag ich nicht anzugeben. Die Tatsache zeigt, daß in unserem Verständnis der Absorptionsvorgänge einstweilen noch eine Lücke vorhanden ist.

---

[1]) Loeb, Pflügers Archiv, Bd. 75, S. 303. 1899.

[2]) Nach unveröffentlichten Beobachtungen, welche Dr. Bullot in meinem Laboratorium gemacht hat.

Es wird nach dem Gesagten niemanden wundern, daß die Eier, die mit einer $2\frac{1}{2}$ N Kochsalz- oder Rohrzuckerlösung behandelt wurden, nicht mehr imstande waren, sich zu entwickeln. Will man die unbefruchteten Eier veranlassen, sich zu Larven zu entwickeln, so muß man Lösungen von geringerem osmotischen Druck wählen, in denen die Eier nicht so stark geschädigt werden. Allerdings findet dann keine Membranbildung statt, vermutlich weil es zu keiner so stürmischen Ausscheidung von Wasser an der Oberfläche kommt.

Wenn ich nun auch der Meinung bin, daß eine Phase des Befruchtungsvorgangs im Ei in einem Auspressen von Flüssigkeit aus dem Protoplasma besteht, wodurch die Bildung der Befruchtungsmembran zustande kommt, so glaube ich doch nicht, daß diese Sekretionserscheinung notwendigerweise darauf hinweist, daß das Spermatozoon den osmotischen Druck im Ei erheblich ändert. Es ist durchaus möglich, daß das Spermatozoon eine Flüssigkeitsaufnahme und spätere Flüssigkeitsausscheidung durch andere Mittel veranlaßt.

XIV.

Über die Natur der Lösungen, in welchen sich die Seeigeleier zu entwickeln vermögen[1]).

1. Die Versuche über die Salze, welche zur Erhaltung des Lebens der Seetiere nötig sind, haben einige allgemeine Gesetze ergeben. Wir müssen zwischen zwei Gruppen von Seetieren unterscheiden, nämlich solchen, welche ebensogut in destilliertem Wasser leben können wie in Seewasser, und solchen, welche in destilliertem Wasser nicht existieren können. Zu den ersteren gehören relativ wenig Tiere; als Beispiel möchte ich Fische erwähnen, z. B. Fundulus. Zur zweiten Klasse gehört die überwiegende Mehrzahl der Seetiere. Für die letzteren nun glaube ich den Satz aufstellen zu dürfen, daß ihre Unfähigkeit, in destilliertem Wasser zu leben, nicht oder nicht in erster Linie durch den Unterschied des osmotischen Druckes zwischen Seewasser und destilliertem Wasser bedingt ist, sondern durch das Fehlen bestimmter Salze in dem letzteren. Es war allgemein geglaubt worden, daß die Seetiere in destilliertem Wasser deshalb nicht leben können, weil sie hier durch das

[1]) Archiv für die ges. Physiologie, Bd. 103. 1904.

in ihre Gewebe eindringende Wasser getötet werden. Nachdem aber schon Plateau Bedenken gegen diese Ansicht erhoben hatte, glaube ich in zwei Arbeiten gezeigt zu haben, daß die Giftwirkung des destillierten Wassers zum Teil — wenn nicht wesentlich — darauf zurückzuführen ist, daß dem destillierten Wasser gewisse Salze fehlen, in erster Linie Natrium-, Kalium- und Kalziumsalze [1]). Daß das richtig ist, kann leicht dadurch gezeigt werden, daß diese Klasse von Seetieren nahezu ebenso rasch in einer mit dem Seewasser isosmotischen Zuckerlösung oder der Lösung anderer Salze als der Na-, Ca- und K-Salze stirbt wie in destilliertem Wasser.

Bringt man sie aber in eine Lösung, welche Natrium-, Kalium- und Kalziumchlorid in dem Verhältnisse enthält wie das Seewasser, so leben die Seetiere in einer solchen Lösung eine lange Zeit. Außer den erwähnten drei Salzen kommt noch $MgCl_2$ in Betracht, aber mit einem viel geringeren Grade der Notwendigkeit. Stellt man sich nämlich eine Lösung her, welche nur zwei der erstgenannten drei Chloride und außerdem $MgCl_2$ enthält, so sterben die Seetiere in einer solchen Lösung viel früher als in einer Lösung von NaCl, KCl und $CaCl_2$. Fügt man aber $MgCl_2$ zu einer Lösung der drei Chloride, so leben die Tiere meist etwas länger als ohne $MgCl_2$.

[1]) Pflügers Archiv, Bd. 97, S. 394, 1903 und Bd. 101, S. 340. 1904.

Wo es sich bloß um die Erhaltung des Lebens handelt, da dürfte im wesentlichen die Lösung von NaCl, $CaCl_2$, KCl und $MgCl_2$ ausreichen. Wo es sich aber um Entwicklungs- und Wachstumsvorgänge handelt, scheint noch eine neue Bedingung hinzuzukommen, nämlich eine Regulationsvorrichtung, welche die Lösung völlig oder nahezu neutral zu halten imstande ist. Im Seewasser übernimmt das $NaHCO_3$ und Na_2HPO_4 diese Rolle. In der Tat genügt, wie ich gezeigt habe, der Zusatz einer kleinen Menge $NaHCO_3$ zu der obenerwähnten Lösung, um in derselben die Stämme von Tubularia zu normal rascher Regeneration und Wachstum zu veranlassen[1]). Da der Zusatz einer kleinen Menge von NaHO in demselben günstigen Sinne wirkt wie der Zusatz von $NaHCO_3$ oder Na_2HPO_4, während der Zusatz von Säure nur eine ungünstige Wirkung hat, so scheint das $NaHCO_3$ zur Neutralisation einer Säure nötig zu sein. Auch ein Zusatz einer kleinen Quantität von Sulfaten erweist sich als günstig, aber nicht als absolut unerläßlich.

Ich habe nun neuerdings untersucht, welche Salzlösungen für die Entwicklung von Seeigellarven nötig sind, und bin zu Resultaten gekommen, welche mit den vorhin gegebenen Daten wesentlich übereinstimmen. Man wird vielleicht fragen, warum ich

[1]) Pflügers Archiv, Bd. 99, S. 637, 1903 und Bd. 101, S. 340. 1904.

es nach den eingehenden und gründlichen Untersuchungen von Herbst noch für nötig gehalten habe, diesen Gegenstand noch einmal aufzunehmen. Die Antwort darauf lautet, weil Herbst behauptet hat, daß jeder im Seewasser enthaltene Bestandteil — selbst Fe — und außerdem eine alkalische Reaktion für die Entwicklung dieser Larven nötig sei, was mir zweifelhaft erschien; und zweitens wollte ich wissen, ob der Unterschied im Grade der Notwendigkeit, den ich allgemein zwischen Mg-Salzen einerseits und Na-, K- und C-Salzen andererseits fand, auch für die Entwicklung der Seeigeleier gilt. Es war mir mit anderen Worten darum zu tun, zu sehen, ob ein sonst allgemein gültiges Gesetz auch für die Entwicklung der Seeigeleier gültig ist.

2. Die giftige Wirkung des destillierten Wassers auf viele Seetiere setzt sich aus zwei Summanden zusammen: der Wirkung, welche das Eindringen von destilliertem Wasser in das Ei hat, und zweitens der Wirkung, welche das Fehlen bestimmter Salze in der das Ei umgebenden Flüssigkeit ausübt. Um ein Urteil über die relative Bedeutung des ersten Summanden zu gewinnen, wurden zunächst Versuche mit destilliertem Wasser und Zuckerlösungen angestellt. Als Versuchsmaterial dienten die Eier von Strongylocentrotus purpuratus. Dieselben wurden im Seewasser befruchtet und unmittelbar nach der Befruchtung in das mit destilliertem Wasser oder der Zuckerlösung

verdünnte Seewasser gebracht. Die Zuckerlösungen, welche benutzt wurden, waren $\frac{1}{2}$ oder $\frac{5}{8}$ N Rohrzuckerlösungen. Sie hatten etwas geringeren osmotischen Druck als das Seewasser, dessen osmotischer Druck dem einer $\frac{1}{2}$ N Kochsalzlösung ungefähr gleich ist. Hierbei zeigt sich der Einfluß, den die Verringerung des osmotischen Druckes hat, sehr deutlich. Während der ersten 24 Stunden erwies sich das mit destilliertem Wasser verdünnte Seewasser als viel schädlicher als das mit der $\frac{5}{8}$ N Rohrzuckerlösung vermischte Seewasser. In Mischungen, welche 60 Volumteile Seewasser und 40 Teile destillierten Wassers enthielten, starben die Eier in den ersten Furchungsstadien. Die Eier schwellen, wie ich schon vor Jahren gezeigt hatte, in solchen Lösungen. Nur in Mischungen von 70 Teilen Seewasser und 30 Teilen destillierten Wassers entwickelten sich die Eier zu Larven, die aber am Boden schwammen. Erst in Mischungen von 80 Teilen Seewasser und 20 Teilen destillierten Wassers kam es zur Entwicklung von normalen Larven. In den Mischungen von Seewasser und $\frac{5}{8}$ N Rohrzuckerlösung entwickelten sich die Eier selbst in 40 Volumteilen Seewasser und 60 Volumteilen Rohrzuckerlösung zu Blastulen. In 30 Teilen Seewasser und 70 Teilen der Rohrzuckerlösung dagegen starben sie auf einer frühen Entwicklungsstufe, d. h. während der ersten Furchungsstadien.

Nach drei Tagen jedoch, wenn die normalen Eier ins Pluteusstadium übergegangen sind, ist dieser Unterschied geringer. Nach dieser Zeit findet man vereinzelte Plutei in Lösungen von 70 Teilen Seewasser und 30 Teilen destillierten Wassers, aber sie starben hier gewöhnlich am dritten Tage, während sie in 80 Teilen Seewasser und 20 Teilen destillierten Wassers länger am Leben blieben. Wendet man statt des destillierten Wassers eine $\frac{2}{3}$ N Zuckerlösung an, so bezeichnet eine Mischung von 70 Teilen Seewasser und 30 Teilen Rohrzuckerlösung auch hier die äußerste Grenze der Verdünnung, bei der noch eine Skelettbildung eintritt. Aber die Plutei, die sich in solchen Lösungen bildeten, waren nicht normal. Auch in 60 Teilen Seewasser und 40 Teilen Zuckerlösung blieben die Larven drei bis vier Tage am Leben, ohne jedoch das Pluteusstadium zu erreichen. Mit weniger Seewasser und mehr Zuckerlösung starben die Larven jedoch schon früher.

Der direkte Beweis dafür, daß das Fehlen bestimmter Salze in der umgebenden Lösung eine der wesentlichen Umstände ist, welche die Entwicklung der Seeigeleier in destilliertem Wasser verhindern, wird dadurch geliefert, daß diese Eier sich weder in halbgrammmolekularen Lösungen von irgend einem Salz noch in der Mischung der Lösungen von zwei derartigen Salzen zu entwickeln vermögen. Erst in einer Mischung von Lösungen von drei Chloriden

kann das Arbaciaei sich bis zur Blastula entwickeln; aber auch hier handelt es sich nicht um beliebige Salze, sondern um NaCl, KCl und $CaCl_2$. Will man Plutei erzielen, so muß man $MgCl_2$ und $NaHCO_3$ zufügen [1]).

Strongylocentrotus erfordert auch noch den Zusatz von Sulfaten.

3. Friedenthal hat die Bicarbonate im Blut als Regulatoren bezeichnet, welche dazu beitragen, die Reaktion desselben nahezu neutral zu halten, was für die Lebenserscheinungen nötig ist [2]). Meine Versuche an Gammarus und an Tubularien zeigen, daß für die Wachstums- und Regenerationsvorgänge die Neutralhaltung des Seewassers von größerer Bedeutung ist als für die bloße Erhaltung des Lebens. Entweder wird beim Wachstum mehr Säure gebildet, oder es besteht hierbei eine größere Empfindlichkeit für Säure. Auch die Entwicklung der Eier von Strongylocentrotus erfordert in erster Linie nicht bloß eine neutrale Reaktion, sondern auch die Gegenwart eines Stoffes, der gebildete Säure zu neutralisieren vermag. Ich finde, daß $NaHCO_3$ geeigneter ist als irgend ein anderer Stoff. Unter den verschiedenen hierhin gehörigen Versuchen will ich folgenden erwähnen. Frisch befruchtete Eier von Strongylocentrotus wurden in eine Reihe von Gefäßen verteilt, von denen jedes

[1]) Loeb, American Journal of Physiology, vol. 3, S. 434. 1900.
[2]) Friedenthal, Zeitschr. f. allgem. Physiol., Bd. 1, S. 56. 1902.

100 ccm einer halbgrammmolekularen van't Hoffschen Lösung[1]) enthielt. Einige dieser Lösungen erhielten Zusätze anderer Salze. In der reinen van't Hoffschen Lösung blieben die Eier meist auf den ersten Furchungsstadien stehen, und nur wenige entwickelten sich bis zur Blastula. Ich habe keine Gastrula und sicher keinen Pluteus in einer solchen Lösung gefunden. Wurde aber zu 100 ccm dieser Lösung 0,5 ccm oder 1 ccm oder mehr einer $\frac{n}{8}$ m $NaHCO_3$-Lösung zugesetzt, so entwickelten sich alle Eier, und fast ebenso viele erreichten das Pluteusstadium wie in normalem Seewasser. Auch erfolgt die Entwicklung in einer solchen Lösung ungefähr ebenso rasch wie in normalem Seewasser. Auch der Zusatz von 0,1 ccm einer $\frac{n}{8}$ m Na_2CO_3-Lösung zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung bedingte, daß sich einige Plutei bildeten, die jedoch nicht sehr normal waren und nicht lange lebten. Der Zusatz von 0,2 bis 0,4 $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung macht die Lösung insofern geeigneter für die Entwicklung der Eier, als die Mehrzahl oder alle sich entwickelten. Aber ich habe niemals die Bildung eines Skeletts in solchen Lösungen beobachtet. Man

[1]) Als van't Hoffsche Lösung bezeichne ich eine Lösung, welche die Bestandteile des Seewassers in der relativen Konzentration enthält, in der sie nach van't Hoff im Seewasser enthalten sind, nämlich 100 NaCl, 2,2 KCl, 7,8 $MgCl_2$, 3,8 $MgSO_4$, 1,5 $CaCl_2$.

muß aber hierbei wohl berücksichtigen, daß das NaHO in solchen Lösungen bereits in den ersten 24 Stunden durch die Absorption von CO_2 aus der Luft und durch die in den Tieren gebildete CO_2 neutralisiert war, während die Skelettbildung erst nach 48—72 Stunden erfolgte. Der Zusatz von 0,8 ccm einer $\frac{m}{6}$ Na_2HPO_4-Lösung zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung wirkte ähnlich wie der Zusatz von NaHO. Vielleicht würde dieses Salz, wenn es in größerer Konzentration hätte zugesetzt werden können, ebenso günstig gewirkt haben, wie $NaHCO_3$. Auch 0,5 oder 1 ccm einer $\frac{5}{8}$ m Natriumoxalatlösung, die lange gestanden hatte und etwas alkalisch reagierte, wirkte ähnlich. Der Zusatz von Kaliumzitrat wirkte entschieden weniger günstig. Der Zusatz größerer Mengen Na_2SO_4 oder $MgSO_4$ war nicht imstande, die van't Hoffsche Lösung für die Entwicklung der Eier geeigneter zu machen.

4. Daß der Grad der Notwendigkeit der Magnesiumsalze für die Entwicklung der Eier ein viel geringerer ist als der der Salze von Na, Ca und K läßt sich in schlagender Weise zeigen. Eine halbgrammmolekulare Lösung von 100 NaCl, 3,8 Na_2SO_4, 0,8 $NaHCO_3$ wurde hergestellt, und dieser Lösung wurden KCl, $CaCl_3$ und $MgCl_2$ entweder einzeln oder in Kombination von zwei Salzen zugesetzt, und zwar in der relativen Konzentration, in der diese Salze im Seewasser enthalten sind. In der Grundlösung (100 NaCl, 3,8 Na_2SO_4, 0,8 $NaHCO_3$) trat bei vielen

befruchteten Eiern Cytolyse ein, und nur vereinzelte Eier begannen sich zu furchen. Die Eier gingen aber nie über das Vierzellstadium hinaus. Der Zusatz von nur einem der drei erwähnten Chloride KCl, $CaCl_2$ und $MgCl_2$ begünstigte die Entwicklung nur wenig. Zwar schienen $CaCl_2$ und $MgCl_2$ die Cytolyse zu verhindern, aber die Furchung ging ebenfalls nicht über die ersten Zellteilungen hinaus. Fügte man aber zwei der erwähnten Salze (KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$) zu, so machte sich ein schlagender Unterschied für die verschiedenen Kombinationen geltend. Wählte man $CaCl_2$ und KCl, so erreichten die Eier das Gastrulastadium und blieben mehrere Tage am Leben und in lebhafter Bewegung. Fügte man aber $MgCl_2$ und KCl oder $MgCl_2$ und $CaCl_2$ zu, so gingen die Eier in ihrer Entwicklung nicht über die ersten Furchungsstadien hinaus. Es entwickelte sich niemals eine schwimmende Larve. Der Versuch wurde in mannigfachen Variationen mit demselben Erfolg wiederholt.

Fügte man alle drei Salze $CaCl_2$, KCl und $MgCl_2$ zu, so entwickelten sich die Eier zu Pluteen.

5. Während die Eier von Arbacia in meinen Versuchen in Woods Holl das Pluteusstadium erreichten, wenn die Lösungen keine Sulfate enthielten, habe ich das gleiche bei den hier angestellten Versuchen an Strongylocentrotus nicht beobachtet. Es läßt sich aber zeigen, daß der Grad der Notwendigkeit der Sulfate für die Entwicklung der Eier von Strongylo-

centrotus nicht der gleiche ist wie für K oder Ca. Stellt man sich nämlich eine Lösung her, welche NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$ und $NaHCO_3$ in dem oben angegebenen Verhältnis enthält, so entwickeln sich in einer solchen Lösung die Eier bis zum Gastrulastadium, aber sie können das Pluteusstadium nicht erreichen. Ohne K oder Ca überschreiten die Eier nicht die ersten Furchungsstadien und sind nicht imstande, das Blastulastadium zu erreichen.

6. Die Versuche beweisen also erstens, daß für die Entwicklung der Eier von Strongylocentroten vor allem eine Substanz nötig ist, welche Säuren zu neutralisieren vermag, ohne die Lösung selbst alkalisch zu machen. Am geeignetsten ist hierfür $NaHCO_3$, das in ziemlich großer Menge zugesetzt werden kann. Der Umstand, daß der Zusatz von Na_2CO_3 und NaHO sich weniger günstig erwies als $NaHCO_3$, dürfte daran liegen, daß eine nahezu neutrale Reaktion der Lösung günstiger ist für die Entwicklung als eine alkalische. Daß Na_2HPO_4 in diesen Versuchen keinen vollen Ersatz für $NaHCO_3$ hat, beruht vielleicht darauf, daß die Karbonate bei der Skelettbildung nötig sind. Die Versuche zeigen zweitens, daß die Eier sich nur in solchen Lösungen entwickeln, welche in erster Linie NaCl, $CaCl_2$ und KCl enthalten, und daß $MgCl_2$ und $MgSO_4$ zwar erforderlich sind, aber nicht mit dem gleichen Grad der Notwendigkeit wie die erstgenannten drei Chloride.

7. Diese Tatsachen sind, wie es scheint, allgemein gültig für diejenigen Seetiere, welche nicht in destilliertem Wasser zu leben vermögen. Sie sind aber auch gültig für die Zusammensetzung der Durchspülungsflüssigkeit, in welcher die Gewebe vieler Seetiere, z. B. das Herz, am Leben erhalten werden können, wie neue, in meinem Labaratorium ausgeführte Versuche zeigen. Da außerdem auch die optimale Durchspülungsflüssigkeit für die Organe der Wirbeltiere denselben Charakter besitzt (wie die neuesten Versuche von Friedenthal zeigen) und da dieselbe sich nur durch den osmotischen Druck von der für Seetiere gefundenen optimalen Lösung unterscheidet, so zeigen diese Tatsachen vielleicht einen Weg, auf dem wir eine Einsicht in die Konstitution und Dynamik der lebenden Substanz erlangen können. Um die Frage nach der Synthese lebender Substanz im Tierkörper handelt es sich dabei aber wohl nicht, da ja die Tiere, an welchen unsere Versuche angestellt wurden, von pflanzlicher oder tierischer Nahrung leben.

XV.

Über eine verbesserte Methode künstlicher Parthenogenesis [1]).

Erste Mitteilung.

In einer Reihe von Aufsätzen habe ich eine Methode beschrieben, durch welche es möglich ist, schwimmende Larven aus dem unbefruchteten Ei des Seeigels zu erzeugen. Sie besteht darin, daß man die Seeigeleier ungefähr zwei Stunden lang in Seewasser legt, dessen Konzentration durch Beifügung von ungefähr 15 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl auf 100 ccm Seewasser erhöht ist. Die Entwicklung dieser Eier unterscheidet sich indessen in vier wesentlichen Punkten von denen mit Sperma befruchteten Eiern. Erstens bildet das mit Sperma befruchtete Ei eine charakteristische Membran, sobald das Spermatozoon eingedrungen ist, während die unbefruchteten, mit hypertonischem Seewasser behandelten Eier sich ohne Membranbildung entwickeln. Zweitens ist der Gang der Entwicklung ein bedeutend rascherer bei dem befruchteten Ei als bei dem parthenogenetisch sich entwickelnden. Drittens steigen die aus befruchteten

[1]) University of California publications. Physiology. 25. Februar 1905. Vol. II, Nr. 9.

Eiern herstammenden Larven an die Oberfläche des Wassers, sobald sie zu schwimmen anfangen, während die durch den erwähnten osmotischen Prozeß erzeugten auf dem Boden des Gefäßes schwimmen. Viertens ist die Zahl der aus befruchteten Eiern entwickelten Larven in der Regel 100%, während bei der künstlichen Parthenogenese der Prozentsatz der schwimmenden Larven bedeutend geringer ist. Bei Arbacia gelang es mir, oft mehr als 20% der unbefruchteten Eier zur Entwicklung zu bringen; mit Strongylocentrotus — der Form des Seeigels, welche in Pacific Grove am häufigsten ist — war ich selten imstande, einen ebenso hohen Prozentsatz sich entwickelnder Eier zu erhalten. Oft genug erhielt ich nur einen Bruchteil von 1% schwimmender Larven aus den Eiern, die mittelst der osmotischen Methode künstlicher Parthenogenese behandelt waren.

Beim Nachforschen über die möglichen Ursachen dieser Differenz zwischen der Entwicklung der mit Sperma befruchteten und der osmotischen Einflüssen ausgesetzten Eier, kam mir der Gedanke, daß das Spermatozoon vielleicht nicht nur eine, sondern mehrere Substanzen oder Zustandsbedingungen in das Ei einführen könnte, von denen jede nur für einen Teil der spezifischen Gestaltung der sexuellen Befruchtung verantwortlich wäre. Alsdann würde es bei Versuchen, die Wirkung des Spermatozoons vollständig nachzuahmen, notwendig erscheinen, zwei

Methoden der künstlichen Parthenogenese zu verbinden, von denen jede allein den Prozeß der sexuellen Befruchtung nur teilweise nachahmt. Diese Idee erwies sich als weit über meine Erwartungen zutreffend.

Im Suchen nach Substanzen, welche zur Erzeugung künstlicher Parthenogenese benutzt werden könnten, versuchte ich die Wirkung von Äthylazetat, ein Mittel, welches sich schon bei meinen Experimenten über die Kontrolle der heliotropischen Reaktion von Süßwasserkrustazeen, die ich in dieser Zeitschrift jüngst veröffentlicht habe, wirksam erwiesen hat. Ich fand, daß die unbefruchteten Eier von Strongylocentrotus, die in 50 ccm Seewasser gebracht wurden, dem ca. 0,6 ccm einer grammolekularen Lösung von Äthylazetat beigefügt ist, nach einem Aufenthalt von zwei bis vier Minuten in diesem Wasser und Zurückbringen in normales Seewasser nicht nur eine Membran bilden[1]), sondern auch anfangen sich zu furchen. Bei einer Temperatur von

[1]) Die Membranbildung bei unbefruchteten Eiern ist schon durch frühere Forscher beobachtet worden. 1887 schon bemerkte O. und R. Hertwig, daß die unbefruchteten Eier eines Seeigels eine Membran bildeten, wenn sie in Seewasser gebracht wurden, dem Chloroform beigefügt war. Herbst fand im Jahr 1893, daß eine gewisse Anzahl von Substanzen, wie Xylol, Toluol, Benzol, in der gleichen Weise wirksam sind. In neuerer Zeit wurden ähnliche Resultate mit Silbersalzen erzielt. (Herbst, Mitteilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel. Vol. 16, S. 445. 1904.)

ungefähr 19—20° C fangen sie, ungefähr fünf oder sechs Stunden nach der Behandlung mit Äthylazetat, an sich in zwei Zellen zu teilen, und später können sie sich in mehrere Zellen teilen. In etwa 24 Stunden jedoch zerfallen sie, und ich habe nie ein Ei gesehen, welches, also behandelt, das Blastulastadium erreicht hätte.

Wenn die Eier in der Mischung von Äthylazetat und Seewasser belassen werden, kommt es weder zur Membranbildung noch zur Furchung. Andererseits gab mir die Anwendung meiner alten Methode künstlicher Parthenogenese dieses Jahr nur geringe Resultate, möglicherweise deshalb, weil die Laichzeit von Strongylocentrotus gerade erst beginnt. Ich vermochte deshalb nur einen Bruchteil von 1 % der unbefruchteten, mit hypertonischem Seewasser (100 ccm Seewasser + 15 ccm 2½ n NaCl) behandelten Eier zu schwimmenden Larven zu entwickeln, und gerade diese Larven starben in der Regel in einer frühen Larvenperiode.

Wenn ich jedoch beide Methoden nacheinander anwendete, also die ursprüngliche osmotische Methode und die Behandlung mit Äthylazetat, erhielt ich überraschende Resultate. Anstatt eines Bruchteils von 1 % sich entwickelnder Eier, hatte ich es in der Hand, 90 bis 100 % der Eier zu entwickeln. Alle diese bildeten eine Membran, was charakteristisch für die mit Sperma befruchteten Eier ist. Der Verlauf der Furchung war

im wesentlichen der gleiche wie bei denen mit Sperma befruchteten Eiern eines Weibchens. Ein großer Prozentsatz der Blastulae, welcher aus dieser Verbindung der Methoden hervorging, erschien völlig normal und stieg an die Oberfläche des Seewassers. Ihre weitere Entwicklung in Gastrulae und Plutei geschah mit der gleichen Geschwindigkeit wie die der Vergleichseier, welche durch Sperma befruchtet waren, auch zeigten die Larven einen gleichen Grad von Lebensfähigkeit.

Die Reihenfolge, in welcher diese beiden Methoden, d. h. also die Behandlung der Eier mit Äthylazetat und mit hypertonischem Seewasser, zur Anwendung gebracht wurden, war nicht ohne Bedeutung. Die Resultate waren viel besser, wenn die Eier zuerst mit hypertonischem Seewasser und nachher mit Äthylazetat behandelt wurden, als bei umgekehrter Reihenfolge. Das gewöhnliche Verfahren war, die unbefruchteten Eier etwa 2 Stunden und 20 Minuten in eine Mischung von 100 ccm Seewasser und 15 ccm N NaCl bei einer Temperatur von ungefähr 19 oder 20° C zu bringen. Alsdann kamen die Eier in normales Seewasser, wo sie ungefähr fünf oder zehn Minuten blieben, und dann in ein anderes Gefäß mit 50 ccm Seewasser. Diesem wurde dann 0,6 ccm einer grammolekularen Lösung von Äthylazetat tropfenweise zugefügt, das Ganze mit einer Pipette umgerührt, um eine rasche und vollständige Mischung des

Äthylazetats und des Seewassers herbeizuführen und die Eier dem verdünnten Äthylazetat auszusetzen.

Von Zeit zu Zeit wurden einige, Eier enthaltende, Tropfen in ein Uhrschälchen mit ca. 10 ccm reinem Seewasser gefüllt, um zu sehen, ob die Eier soweit waren, eine Membran zu bilden. Sobald die Eier die Membran bei Überführung in normales Seewasser zeigten, wurden sie aus der Äthylazetatlösung in normales Seewasser übergeführt. Dies war gewöhnlich zwei bis vier Minuten nach dem Übertragen der Eier in die Äthylazetatlösung der Fall.

Wurden die Eier zu früh herausgenommen, besonders zur Zeit, wo nur eine Anzahl, aber nicht alle eine Membran gebildet hatten, so wiesen in der Regel nur solche Eier eine normale und rasche Furchung auf, welche eine Membran gebildet hatten. Die anderen zeigten meist überhaupt keine Furchung, oder wenn sie ausnahmsweise sich doch teilten, so geschah dies nur etwa in dem gleichen Prozentsatz wie bei den nur mit hypertonischem Seewasser behandelten Eiern. Die Tatsache, daß in solchen Fällen nur diejenigen Eier sich entwickelten, welche eine Membran gebildet hatten, ist eine weitere Übereinstimmung zwischen dieser neuen Methode künstlicher Parthenogenese und geschlechtlicher Befruchtung.

Es ist somit unzweifelhaft, daß wir jetzt in der Lage sind, den Prozeß der geschlechtlichen Befruchtung des Eies des Seeigels vollständig und in allen

wesentlichen Zügen mit physikalischen und chemischen Mitteln nachzuahmen. Die Tatsache, daß eine große Zahl der nach meiner Methode erzeugten parthenogenetischen Larven dieselbe Lebensfähigkeit zu haben scheint, wie die durch normale Befruchtung erzielten, berechtigt zur Hoffnung, daß es jetzt möglich sein wird, die Lösung verschiedener Probleme, für welche eine Erzeugung parthenogenetischer Larven in großer Zahl Vorbedingung ist, in Angriff zu nehmen.

XVI.

Über eine verbesserte Methode künstlicher Parthenogenese[1]).

Zweite Mitteilung.

In einer früheren Notiz habe ich dargelegt, daß der Befruchtungsprozeß und die natürliche Entwicklung der Seeigeleier in allen wesentlichen Einzelheiten durch eine Verbindung zweier Behandlungsmethoden nachgeahmt werden konnte, nämlich durch ein erstes Einlegen der Eier etwa zwei Stunden lang in hypertonisches Seewasser, und ein zweites darauffolgendes Einbringen auf wenige Minuten in Seewasser mit einem geringen Zusatz von Äthylazetat. Es erschien wünschenswert, festzustellen, welche Gruppe von chemischen Verbindungen fähig war, eine Wirkung wie Äthylazetat in einem derartigen Versuch auszuüben. Die Lösung von Äthylazetat, welche ich bei diesen Versuchen benutzte, war ungefähr sechs Monate vorher hergestellt worden und enthielt ein beträchtliches Quantum freier Essigsäure. Ich untersuchte, ob es möglich wäre, Essigsäure statt

[1]) University of California publications Physiology. Vol. 2, Nr. 11. 16. März 1905.

Äthylazetat zu verwenden. Es fand sich, daß, wenn unbefruchtete Eier des Seeigels bei einer Temperatur von ungefähr 20° eine bis zwei Minuten in 50 ccm Seewasser gelegt werden, dem ungefähr 4 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure beigefügt waren, diese Eier die charakteristische Membran des Befruchtungsprozesses bildeten, sobald sie in normales Seewasser zurückgebracht waren. Wurden die Eier in dem angesäuerten Seewasser gelassen, so bildete sich keine Membran, ebensowenig, wenn sie etwas zu früh oder zu spät aus dem gesäuerten Seewasser herausgenommen wurden. Wurde eine geringere Menge Essigsäure, als erwähnt, beigefügt, so wurde die erforderliche Zeit der Einwirkung auf die Eier verlängert, bei größerer Konzentration verkürzt. Bezüglich des Membranbildungsprozesses verhielt sich also die Essigsäure wie Äthylazetat.

Die Essigsäure wirkte auch ganz gleich wie Äthylazetat auf die nachfolgende Entwicklung des unbefruchteten Eies. Unbefruchtete Eier zwei oder drei Minuten einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 4 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure ausgesetzt, zerfielen in weniger als 24 Stunden, ohne Entwicklung zu zeigen. Wurden die Eier aber vor dem, eine bis zwei Minuten dauernden, Einbringen in die Mischung von Seewasser und Essigsäure ungefähr zwei Stunden einer Mischung von 100 ccm Seewasser + 14 oder 15 ccm von $2\frac{1}{2}$ N NaCl

ausgesetzt, so bildeten sie nach der Einwirkung der Säure und dem Zurückbringen in normales Seewasser nicht nur eine Membran, sondern sie furchten sich auch und entwickelten sich zu Larven. War die Zeit der Einwirkung richtig gewählt, so entwickelten sie sich auf gleiche Art und Weise wie die mit Sperma befruchteten Eier. Die Larven stiegen an die Oberfläche gleich denen, die aus Eiern hervorgingen, welche mit Sperma befruchtet waren.

Bei diesen Versuchen ist die Dauer der Einwirkung der Säure auf das Ei ein besonders wichtiger Faktor. Ich gewann die Überzeugung, daß eine verhältnismäßig kurze Dauer der Einwirkungszeit einer hohen Säurekonzentration bessere Larven ergab, als eine längere Einwirkung einer geringeren Konzentration von Essigsäurelösung in Seewasser. Aus diesem Grunde wurde das erwähnte Verhältnis von Seewasser und Essigsäure gewählt. Wenn 5 oder 6 ccm Säure 50 ccm Seewasser zugesetzt wurden, wurde die Dauer der günstigsten Einwirkung so kurz, daß es schwierig war, die Eier rasch genug aus der Lösung wieder zu entfernen. Der Charakter der aus unbefruchteten Eiern entwickelten Larven hängt von der Einwirkungsdauer der Säure auf die Eier ab. In der Regel verfuhr ich folgendermaßen: Die Eier wurden aus dem hypertonischen Seewasser in normales Seewasser überführt und dann 4 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure beigefügt, unter fortwährendem Umrühren mit einer Pipette. Diese

Prozedur dauerte etwa 15 Sekunden. Dann wurden in Zwischenräumen von 15 Sekunden verschiedene Portionen von Eiern herausgenommen und jede in eine besondere Schale mit normalem Seewasser übergeführt. Die erste und zweite so herausgenommene Portion bildete in der Regel keine Membranen. Die Bildung derselben begann an wenigen Eiern in der dritten, an mehreren in der vierten Portion, und wurde allgemein in den übrigen gefunden, die bis ungefähr drei Minuten nach Einlegen in das Säurewasser herausgenommen waren. Nach längerer Einwirkung hörte die Membranbildung wieder auf. Manchmal begann sie nicht in der dritten, sondern erst in einer späteren Portion. Ich fand, daß nur solche Eier sich entwickelten, welche eine Membran gebildet hatten, und daß von diesen hauptsächlich nur diejenigen vollständig normale Larven ergaben — also solche, die an die Oberfläche stiegen — welche in den ersten zwei oder drei Portionen enthalten waren, in welchen die Membranbildung zuerst vor sich ging. Es ist somit zweifellos, daß bei Produktion normaler Larven aus unbefruchteten, vorher mit hypertonischen Seewasser behandelten Eiern die Zeit der Säurewirkung nur um ein geringes das für die Hervorbringung der Membran verlangte Minimum überschreiten darf. Möglicherweise muß dieses Minimum um wenige Sekunden überschritten werden, da ich öfters bemerkte, daß in der ersten Portion, in welcher

die Membranbildung begann, nicht jedes Ei, welches eine Membran bildete, sich sofort oder überhaupt weiter entwickelte. In den späteren Portionen bilden alle Eier eine Membran und alle können sich entwickeln, aber nicht alle erzielen Larven, welche an die Oberfläche steigen; es scheint, daß der Prozentsatz der sich zu derartigen Larven entwickelnden Eier am größten ist in den ersten zwei oder drei Portionen, in welchen die Membranbildung beginnt.

Eine Anzahl anderer Säuren wurden dann ebenfalls versucht. Die Wirkungen der Essigsäure bei der Membranbildung konnte leicht erzielt werden mit Ameisensäure und CO_2; 4 ccm einer $\frac{N}{10}$ Ameisensäure hatten ungefähr die Wirkung von 4 ccm von $\frac{N}{10}$ Essigsäure. Ich versuchte CO_2 in Form von kohlensaurem Wasser (Shasta Wasser), welches durch Beifügen einer genügenden Menge einer Lösung von 2½ N NaCl mit Seewasser isotonisch gemacht war. Ungefähr 60 ccm Shastawasser mußten 50 ccm Seewasser beigefügt werden, um die gleichen Resultate wie mit 4 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure zu erhalten.

Versuche mit HCl haben für gewöhnlich negative Resultate, die mit Weinstein- und Oxalsäure nur negative ergeben. Wurden unbefruchtete Eier eine oder zwei Minuten in 50 ccm Seewasser gebracht, dem 4 ccm $\frac{N}{10}$ HCl beigefügt waren, so bildeten nur wenige

Eier Membranen, nachdem sie aus der Lösung heraus und in normales Seewasser zurückgebracht waren. Während aber die Membranen, welche nach der Behandlung mit Essig-, Ameisen- und Kohlensäure gebildet waren, so normal wie die mit Sperma befruchteten sich zeigten, waren die mit Salzsäure erzielten stets abnorm. Möglich wäre es indessen vielleicht doch, daß sich durch Fortsetzung dieser Versuche mit Salz-, Weinstein- und Oxalsäure noch bessere Resultate erzielen ließen.

Die mit Essigsäure erzielten Resultate legten die Frage nahe, ob die Wirkung des Äthylazetats ganz oder teilweise der freien Essigsäure zugeschrieben werden muß. Durch Titration ließ sich zeigen, daß das Äthylazetat genug freie Essigsäure enthält, um die gedachte Wirkung herbeizuführen. Eine frische Äthylazetatlösung, welche nur eine Spur Essigsäure enthielt, rief den Prozeß der Membranbildung nicht hervor. Äthylformiat mit leichter Säurereaktion rief die Membranbildung hervor, wenn es in angegebener Weise statt Äthylazetat angewendet wurde.

In meiner ersten Notiz legte ich dar, daß das Spermatozoon möglicherweise auf das Ei zwei verschiedene Wirkungen haben könnte, die eine gleich der des Äthylazetats, die andere gleich der des hypertonischen Seewassers. Es scheint gewiß, daß die Säurewirkung nicht allein in einer quantitativen Vermehrung der Wirkungen des hypertonischen See-

wassers besteht. Behandeln wir die unbefruchteten Eier mit Säure allein (ohne hypertonisches Seewasser), so zerfällt jedes Ei, welches eine Membran gebildet hat, in weniger als 24 Stunden. Die nur mit hypertonischem Seewasser zwei Stunden behandelten Eier dagegen bilden keine Membran und zerfallen nicht. Es zeigt dieses einen mehr als nur quantitativen Unterschied in den Wirkungen der beiden Agentien. Die Verbindung der beiden Methoden ergibt bei sorgfältiger Aufmerksamkeit auf Temperatur, Konzentration und Einwirkungsdauer einen Entwicklungsprozeß, der in allen Erscheinungen identisch mit der Wirkung des Eindringens des Spermatozoons ist.

XVII.

Über eine verbesserte Methode künstlicher Parthenogenese[1]).

Dritte Mitteilung.

In Übereinstimmung mit den in meinen beiden vorhergehenden Mitteilungen beschriebenen Methoden wurden die unbefruchteten Eier des Seeigels (Strongylocentrotus purpuratus) zuerst zwei Stunden lang hypertonischem Seewasser (100 ccm Seewasser + 15 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung)[2]) ausgesetzt, und dann mit Essig- oder Ameisensäure behandelt, um eine Membran zu erzeugen. Da in dem Befruchtungsprozeß durch Samen die Membran unmittelbar nach dem Eintritt des Spermatozoon gebildet wird, glaubte ich, daß bei einer vollständigen Nachahmung der befruchtenden Wirkungen des Spermatozoons durch chemische Mittel die Membranbildung ebenfalls das erste Vorkommnis in der Reihe der Vorgänge sein müßte. Ich hatte jedoch mit der Schwierigkeit zu kämpfen, daß, wenn die Membranbildung zuerst verursacht wird, und die Eier erst

[1]) University of California publications. Physiology. Vol. II, Nr. 14. 18. Mai 1905.

[2]) Auf diese Mischung wird kurz als „hypertonisches Seewasser" hingewiesen werden.

dann zwei Stunden lang dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt werden, in der Regel sich keine Larven entwickeln. Ich habe seitdem gefunden, daß diese Schwierigkeit überwunden werden kann, und daß selbst das letzte Postulat einer vollständigen Nachahmung des Befruchtungsprozesses durch chemische Mittel erfüllt werden kann, nämlich, daß die zeitliche Ordnung der Vorgänge in beiden Fällen dieselbe sein soll. Es ist nur notwendig, die Eier, welche schon eine Membran besitzen, für eine beträchtlich kürzere Zeit als zwei Stunden, nämlich 25—50 Minuten dem hypertonischen Seewasser auszusetzen, je nach Temperatur und Verschiedenheiten der Eier von verschiedenen Weibchen.

Mein Verfahren ist folgendes: Die Eier werden zuerst mit einer Säure behandelt, welche Membranbildung verursacht. Zu diesem Zweck werden 3 ccm einer $\frac{N}{10}$-Lösung einer Fettsäure z. B. Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure oder Valeriansäure usw. zu 50 ccm Seewasser zugesetzt. Die Eier bleiben in dieser Lösung $^1/_2$—$1^1/_2$ Minuten. Wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht werden, bilden sie eine Membran, welche sich durch nichts von der Befruchtungsmembran unterscheidet. Die Eier bleiben dann 5—10 Minuten in normalem Seewasser und werden dann in eine Mischung von 100 ccm Seewasser + 15 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung gelegt, worin sie 20—50 Minuten bleiben. Da die genaue Zeit, wann

sie aus diesem hypertonischen Seewasser herausgenommen werden sollen, nicht im voraus bestimmt werden kann und auch nicht allein von der Temperatur abhängig ist, ist es nötig, von Zeit zu Zeit, in 3—5 Minuten, Portionen der Eier in normales Seewasser zurückzubringen. Wenn sie nur einige Minuten zu lang in dem hypertonischen Seewasser gelassen werden, so kann die Entwicklung abnorm sein[1]).

Wenn wir in dieser Weise verfahren, findet die erste Teilung der Eier (bei einer Temperatur von 19° C) ungefähr in 1 Stunde und 10 Minuten statt, nachdem sie aus hypertonischem in normales Seewasser versetzt sind. Die Furchung ist bei einem gewissen Prozentsatz der Eier von Anfang an vollkommen normal und bleibt es auch durchaus. Die Bildung von Mikromeren kommt bei diesen Eiern gerade so gut zustande wie bei befruchteten und die Schnelligkeit der Furchung und der Entwicklung ist auch dieselbe, wie bei befruchteten Eiern desselben Weibchens unter denselben Temperaturverhältnissen. Die Blastulahöhle bildet sich bei diesen Eiern ebenso früh und in derselben Weise, wie bei den befruchteten, und die Blastulae fangen ebenso früh an zu schwimmen und sich zu der Oberfläche zu erheben wie jene, die

[1]) Eine Mitteilung über diese neue Methode wurde der Gesellschaft für experimentelle Biologie und Medizin in New-York in der Versammlung am 19. April gemacht.

sich aus befruchteten Eiern entwickeln. Wenn die Larven, welche sich zur Oberfläche erheben, in ein Uhrglas gesammelt werden, so ist es schwierig, sie von den aus befruchteten Eiern stammenden Larven zu unterscheiden. Sie entwickeln sich zu Gastrulae und Plutei in demselben Verhältnis wie die Larven, welche aus mit Samen befruchteten Eiern entstehen. Es ist leicht eine unbegrenzte Zahl normaler Plutei aus den mit dieser neuen Methode behandelten Eiern zu erzeugen und zu sammeln.

II.

Wenn das Experiment nach diesen Anweisungen ausgeführt wird, zeigen die verschiedenen in kurzen Zwischenräumen aus dem hypertonischen Seewasser herausgenommenen Portionen von Eiern die folgenden Unterschiede in ihrer Furchung und Entwicklung. Wenn bei einer Temperatur von 19° C die erste Portion der Eier nach 20 Minuten aus dem hypertonischen in normales Seewasser versetzt wird, wird sich in der Regel bei dieser Portion kein Ei teilen. Möglicherweise wird auch in der nächsten Portion (mit 25 Minuten langem Verbleiben in dem hypertonischen Seewasser) kein Ei sich teilen, aber in einer der hypertonischen Lösung 30 Minuten lang ausgesetzten Portion, kann ein gewisser kleiner Prozentsatz der Eier sich furchen, obgleich ein weniger später, als in einigen der folgenden Portionen. Obgleich es vorkommt, daß die Zell-

teilung nicht ganz und gar symmetrisch ist, ist das Resultat ein vollkommen zweizelliges Stadium. Es würde schwer halten, einen Unterschied zwischen dem zweizelligen Stadium dieser Eier und demjenigen der befruchteten Eier zu finden. Einige der Eier mögen sich in einer weniger normalen Weise teilen. Die Verhältniszahl der normal geteilten gegenüber den abnormal geteilten Eiern ist in der Tat sehr groß, gewiß größer als eins. Wenn schon einige Eier in der Portion, welche die 30 Minuten lang der hypertonischen Wirkung ausgesetzen Eier enthält, sich teilen, so furchen sich in der 35-Minutenportion viel mehr Eier. Auch hier ist die Zahl der normal geteilten Eier größer als die der abnorm geteilten, aber nur ein Bruchteil der Totalsumme der Eier teilt sich. Die nächste Portion mit 40 Minuten Einwirkungszeit zeigt plötzlich eine entschiedene Veränderung. Die Mehrzahl, wenn nicht alle Eier, teilen sich, aber das Verhältnis der normal geteilten Eier gegenüber der abnormal gefurchten, ist kleiner als in der vorhergehenden Portion. In der Regel geht ungefähr die Hälfte der Eier in ein normales zweizelliges Stadium über und die Furchung beginnt in der Regel bei dieser Portion ein wenig früher als in den beiden vorhergehenden. In den folgenden Portionen vermindert sich die Zahl der Eier, welche sich teilen, wieder nach und nach, obgleich langsam, dagegen vermindert sich das Verhältnis der Eier, welche in ein normal zweizelliges

Stadium gehen, gegenüber den abnorm gefurchten, schnell. Von den Eiern, welche eine Stunde und noch länger dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt waren, beginnen nicht eines oder mindestens nur wenige ihre Entwicklung mit einem normal zweizelligen Stadium.

Ich habe den Eindruck erhalten, daß der Charakter der ersten Furchung schon die relative Zahl der normalen Embryonen bestimmt, welche sich zur Oberfläche des Seewassers erheben und sich zu normalen Plutei entwickeln werden. Das Verhältnis der normalen Larven in einer Portion Eier scheint mit dem Verhältnis der Eier, welche schon gleich im Anfang eine normale Furchung zeigen, parallel zu laufen und ich neige der Ansicht zu, daß diese Eier die meisten, wenn nicht alle normalen Larven ergeben, die durch diese Methode erhalten werden. Wenn die Temperatur niedriger ist, gelegentlich auch bei einer Temperatur von 20° C, ist die erste Portion Eier, welche Furchung zeigt, diejenige, die ein wenig länger als 30 Minuten dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt war. In diesem Falle bleibt alles wie es vorher dargelegt wurde, ausgenommen die Einwirkungszeit. Um die Entwicklung zu verursachen, können 45—50 Minuten der Einwirkung von hypertonischen Seewasser nötig sein. Es ist möglich, vor der eigentlichen Furchung zu bestimmen, welche Portionen dem hypertonischen Seewasser zu lange ausgesetzt waren. Bei

den Eiern des Strongylocentrotus ist die Erscheinung der Kernteilung schon im lebenden Ei erkennbar. Die Eier, welche der Lösung allzulange ausgesetzt waren, zeigen vor dem Anfang der Teilung eine unregelmäßige Spindelbildung und oft vielfache Kerne. Portionen von Eiern, bei welchen diese Erscheinung sehr verbreitet ist, geben wenige oder keine normalen Larven, die sich zur Oberfläche erheben. Die Empfindlichkeit der Eier desselben Weibchens für hypertonisches Seewasser ist ebenfalls verschieden, und aus diesem Grunde kann man finden, daß in derselben Portion Eier die günstigste Zeit der Einwirkung für einige schon überschritten ist, während sie für andere noch kaum erreicht war.

III.

Was ist nun der relative Anteil der in dem Prozeß der physiko-chemischen Befruchtung benutzten zwei Agentien? Wenn wir nur die Membranbildung mit Hilfe einer Fettsäure in der oben beschriebenen Weise hervorrufen, ohne die Eier dem hypertonischen Seewasser auszusetzen, zeigen sie nach $1^1/_2$—2 Stunden (bei 19° C) dieselben sichtbaren Veränderungen, welche bei befruchteten Eiern der Zellteilung vorangehen und welche ich für eine Andeutung der Spindelbildung halte. Während bei den befruchteten Eiern auf diese sichtbaren Kernveränderungen die Zellteilung unmittelbar folgt, findet der letztere Prozeß in den Eiern,

in denen Membranbildung hervorgerufen wurde, die aber nicht dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt wurden, gar nicht statt, oder erst nach 3—6 Stunden oder noch längerer Zeit. Dagegen beginnt fast in allen Eiern nach ungefähr drei Stunden ein Prozeß der Zersetzung, welche in einem allmählichen Hervorquellen kleiner Tröpfchen aus dem Eiprotoplasma besteht. Diese Zersetzung beginnt immer an einer Seite des Eies (wo die Mikromerenmaterie liegt?) und führt in der Regel in weniger als 24 Stunden zum vollständigen Zerfall. Wenn dieselben Eier aber nach der Bildung der Membran 30—50 Minuten lang hypertonischem Seewasser ausgesetzt werden, zerfallen sie nicht, sondern fangen an sich nach ungefähr 1 Stunde 10 Minuten zu teilen.

Wenn wir Eier ohne Membran hypertonischem Seewasser 30—50 Minuten lang aussetzen, bleiben die Eier sogut wie unverändert und unterscheiden sich in ihrem Aussehen gar nicht von unbefruchteten Eiern, die im normalen Seewasser geblieben sind.

Daher scheint es, daß die Veränderungen, welche mit der Membranbildung verbunden sind, auch den Apparat für die Kernteilung in Tätigkeit versetzen; aber aus irgend einem Grunde findet die Zellteilung gar nicht statt, oder nur sehr spät. Die nachfolgende Behandlung mit hypertonischem Seewasser dient daher zwei Zwecken: 1. die Zellteilung möglich zu machen oder zu beschleunigen und 2. die zerstörenden Pro-

zesse zu verhüten, welche unabänderlich dem Prozeß der Membranbildung durch Säure folgen, wenn das Ei nicht außerdem hypertonischem Seewasser ausgesetzt wird. Ich war begierig zu erfahren, ob die obenerwähnten Zerstörungsprozesse, welche der Membranbildung durch eine Säure folgen, nur eine Funktion der Membranbildung sind, oder ob sie eine allgemeine Säurewirkung darstellen. Es scheint, daß das erstere der Fall ist. Ich habe schon in einer früheren Schrift dargelegt, daß das zu frühe Herausnehmen der Eier aus dem angesäuerten Seewasser — in welchem Falle nicht alle Eier eine Membran bilden, wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht werden — bewirkt, daß die Eier mit einer Membran zerfallen, während die anderen einer solchen Veränderung nicht unterworfen sind, und lebendig bleiben. Wenn die Eier mit einer Säure behandelt werden, welche für die Membranbildung unpassend ist, z. B. mit Salpetersäure, findet der obenerwähnte Zerfallsprozeß nicht statt.

Wenn Eier, bei denen die Membranbildung durch eine Säure hervorgerufen wurde, nicht lange genug dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt werden, sind sie demselben Prozeß der Zersetzung unterworfen, als wenn sie gar nicht mit hypertonischem Seewasser behandelt wären.

IV.

Die Methode der künstlichen Parthenogenese, welche in meinen beiden vorhergehenden Abhandlungen be-

schrieben wurde, unterscheidet sich von der neuen durch die zeitliche Ordnung, in welcher die Membranbildung und die Wirkung des hypertonischen Seewassers einander folgen. Wenn die Membran zuerst gebildet wird und die Eier nachher mit hypertonischem Seewasser behandelt werden, dürfen die Eier nur $^1/_2$ Stunde bis 40 Minuten in diesem Seewasser liegen. Wenn die Ordnung aber umgekehrt wird und die Eier zuerst dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt werden, während die Membranbildung nachher hervorgebracht wird, müssen die Eier $1^1/_2$—2 Stunden in dem hypertonischen Seewasser bleiben, um eine normale Entwicklung durchzumachen. Wenn bei dieser letzteren Anordnung die Eier $^1/_2$ Stunde bis 40 Minuten dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt sind, und die Membranbildung dann durch eine Säure veranlaßt wird, entwickeln sich die Eier nicht, sondern verhalten sich, als ob nur ihre Membranbildung hervorgerufen wäre, d. h. sie fangen nach einer Anzahl von Stunden an zu zerfallen. Es ist daher klar, daß wir es nicht nur mit einer algebraischen Addition der unabhängigen Wirkungen zweier Agentien zu tun haben.

Eine parallele Reihe von Tatsachen kann erhalten werden, wenn wir versuchen, die Befruchtung der Eier durch Spermatozoen und die Behandlung mit hypertonischem Seewasser zu verbinden. Das Spermatozoon verursacht die Bildung einer Membran. Wenn die Eier zuerst zwei Stunden in hypertonisches

Seewasser gelegt und danach mit Samen befruchtet werden, werden sich viel mehr Eier zu Larven entwickeln, als wenn die Eier zuerst mit Samen befruchtet und dann zwei Stunden dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt werden. Die durch ein Spermatozoon verursachte Membranbildung vermehrt also die Empfindlichkeit des Eies für eine nachfolgende Behandlung mit hypertonischem Seewasser in derselben Weise, wie es die durch eine Säure hervorgerufene Membranbildung tut.

V.

Da diese Experimente die große Bedeutung des Prozesses der Membranbildung bewiesen, war es von Interesse zu bestimmen, welche Substanzen diesen Prozeß hervorrufen können. Augenscheinlich muß eine vollständige Kenntnis dieser Substanzen auch die Substanz in sich schließen, welche die Membranbildung unmittelbar nachdem das Spermatozoon in das Ei eingedrungen ist, zustande bringt.

Ich finde, daß die Substanzen, welche die Membranbildung hervorrufen, in zwei Gruppen geteilt werden können. Die eine Gruppe schließt die Kohlenwasserstoffe in sich und gewisse Substitutionsprodukte derselben, die zweite besteht aus gewissen Säuren. Die zwei Gruppen sind darin voneinander verschieden, daß die Membranbildung unter Einwirkung von Kohlenwasserstoffen stattfindet, während das Ei mit denselben in Berührung steht, dagegen kommt sie bei Säure-

wirkung nicht während der unmittelbaren Berührung zustande, vielmehr erst, nachdem das Ei in normales Seewasser zurückversetzt ist.

O. und R. Hertwig entdeckten, daß die unbefruchteten Eier des Seeigels eine Membran bilden, wenn sie in Chloroform-Seewasser gelegt werden[1]), d. h. in Seewasser, das mit Chloroform gesättigt ist — nur Spuren von Chloroform sind löslich. — Herbst fand, daß Benzol, Toluol und Kreosot ähnlich wirken.[2]) Es schien mir, daß möglicherweise ganz allgemein Kohlenwasserstoffe in dieser Weise wirken könnten, und um dies zu prüfen, verwendete ich Amylen. In der Tat rief es Membranbildung hervor. Diese Methode, eine Membranbildung durch Kohlenwasserstoffe herbeizuführen, hat einen ernsten Nachteil insofern, als die Eier Neigung haben der Cytolyse anheimzufallen und abzusterben. Durch ein schnelles Versetzen der Eier in normales Seewasser können einige gerettet werden.

Die zweite Gruppe schließt nicht alle Säuren in sich, sondern, wie ich schon in einer vorhergehenden Mitteilung andeutete, nur gewisse Säuren. Mit einer Ausnahme (CO_2) sind alle einbasische organische Säuren. Zwei- und dreibasische organische Säuren ebenso wie die Mineralsäuren — wenigstens soweit

[1]) O. und R. Hertwig, Untersuchungen zur Morphologie und Physiologie der Zelle, Heft 5, Jena 1887.

[2]) Herbst, Biologisches Zentralblatt, Bd. XIII, S. 14, 1893 und Mitteilungen aus der Zoologischen Station Neapel, Bd. 16, S. 445. 1904.

ich sie prüfen konnte — passen nicht für diesen Zweck. Die Repräsentanten der Gruppe der niederen Fettsäuren — Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure — geben ausgezeichnete Resultate. Wenn 3 ccm einer $\frac{N}{10}$-Lösung oder eine entsprechende Menge zu 50 ccm Seewasser zugesetzt wird, bildeten alle Eier des Strongylocentrotus eine Membran, wenn sie, nachdem sie $^1/_2 - 1$ Minute dieser Lösung (bei einer Temperatur von 19° C) ausgesetzt waren, in normales Seewasser zurückgebracht wurden. Die höheren Säuren sind sehr unlöslich und dies verursacht gewisse Komplikationen in dem Experiment, nämlich eine Neigung zu Cytolyse; aber abgesehen von dieser Neigung, scheinen Caprylsäure, Nonylsäure, Caprinsäure und Laurinsäure positive Resultate zu geben[1]).

Die Oxysäuren wirkten nicht so gut wie die Fettsäuren. Man mußte die Eier längere Zeit dem angesäuerten Wasser aussetzen und mehr Säure hinzufügen. Unter den versuchten gab β-Oxybuttersäure die besten Resultate. Oxyisobuttersäure war nicht so wirksam. Wenn 9 ccm einer $\frac{N}{10}$-Lösung dieser Säure zu 50 ccm Seewasser hinzugefügt werden, müssen die Eier fünf Minuten in dieser Lösung bleiben, um eine Membran nach Zurückbringen in nor-

[1]) Für eine Anzahl dieser Säuren bin ich Herrn Kollegen Taylor zu Dank verpflichtet.

males Seewasser zu bilden. Milchsäure hatte
fähr denselben niedrigen Grad der Wirksamke
Glycolsäure war noch weniger wirksam.

Aus der aromatischen Gruppe wurden Benzo
und Mandelsäure versucht: Benzoësäure war
wirksam wie die Fettsäuren, und Mandelsäu
nur ein wenig unwirksamer. Während es leicht
jedem unbefruchteten Ei die Membranbildung
Fettsäuren oder mit irgend einer der oben erw
einbasischen Säuren hervorzurufen, erwiesen s
zwei- oder dreibasischen Säuren meist als unw
Oxalsäure, Bernsteinsäure, Malonsäure, Weinste
und Zitronensäure wurden versucht. Nachde
Eier eine lange Zeit diesen Lösungen ausgeset
in normales Seewasser zurückgebracht waren, b
sie eine abnorme Membran, aber diese Me
bildung war von Cytolyse begleitet oder gefolgt.
die Mineralsäuren konnten für diesen Zweck
gebraucht werden. Ich habe eine große Anza
Experimenten mit HNO_3 gemacht. Die besten
tate wurden erhalten, wenn 4 ccm $\frac{N}{10}$ HNO_3 zu
Seewasser hinzugefügt wurden. Wenn die Eie
2—5 Minuten aus dieser Lösung genommen w
kam es in einem gewissen Prozentsatz derselb
Membranbildung, die von Cytolyse begleite
wobei natürlich die Eier absterben. Schw
Lösungen ergaben in einer entsprechenden Zei
Membranbildung. HCl und H_2SO_4 ergaben pr

auch negative Resultate. Um annähernd quantitative Resultate mit CO_2 zu erhalten, gebrauchte ich diese in der Form von kohlensaurem Wasser. Als 60 ccm einer mit CO_2 gesättigten $\frac{m}{2}$ NaClC-Lösung zu 50 ccm Seewasser zugesetzt wurden, wirkte die Mischung ähnlich, wie die Fettsäuren auf den Prozeß der Membranbildung. Wenn es denkbar wäre, daß CO_2 in diesem Falle als eine einbasische Säure (HOCOOH?) wirken könnte, wären wir imstande zu sagen, daß die Gegenwart einer und zwar nur einer Carboxylgruppe allein in der Säure die Membranbildung des Eies nach Entfernung aus der Lösung verursacht.

Die Tatsache, daß Mineralsäuren nur negative Resultate ergaben, brachte mich auf den Gedanken zu versuchen, wie eine Mischung von Mineral- und Fettsäuren wirken würde. Wenn zu 50 ccm Seewasser $2\frac{1}{2}$ ccm $\frac{N}{10}$ HNO_3 zugesetzt und die Eier in dieser Mischung 2—4 Minuten gelassen werden, bilden ungefähr 10% der Eier Membranen, nachdem sie in normales Seewasser zurüchgebracht sind. Doch wird der Vorgang von Cytolyse begleitet. Wenn 2 ccm $\frac{N}{10}$ $HNO_3 + \frac{1}{2}$ ccm $\frac{N}{10}$ Propionsäure statt des oben genannten Zusatzes hinzugebracht werden, bilden alle Eier, welche dieser Mischung für ungefähr zwei Minuten ausgesetzt waren, eine Membran, nachdem sie in normales Seewasser versetzt sind. Die Membran ist

nicht so vollkommen, als wenn 2½ ccm Propionsäure (ohne irgengwelche Salpetersäure) gebraucht worden wäre, aber es folgt darauf keine Cytolyse oder unmittelbarer Tod der Eier. Wenn die Eier ½ oder eine Minute in eine Mischung von 3 ccm $\frac{N}{10}$ Propionsäure + 50 ccm Seewasser gelegt werden, bilden sie alle eine Membran, nachdem sie in normales Seewasser versetzt sind. Wenn statt dessen die Eier in eine Mischung von 1 ccm $\frac{N}{10}$ Propionsäure + 2 ccm $\frac{N}{10}$ Salpetersäure + 50 ccm Seewasser gelegt werden, müssen sie in dieser Mischung wenigstens eine Minute bleiben, ehe sie eine Membran bilden, wenn sie in normales Seewasser zurückversetzt werden. Die Membran ist nicht so vollkommen, als wenn Propionsäure allein gebraucht wird, aber es kommt zu keiner Cytolyse.

Da die Eier keine Membran bilden, wenn sie in dem sauergemachten Seewasser gelassen werden, kam mir der Gedanke, daß die Gegenwart der Säure (oder der Wasserstoff-Ionen) der Membranbildung entgegenwirken möchte. Es war leicht, diese Idee zu prüfen. Wenn Eier in 50 ccm Seewasser, dem 1 ccm Benzol oder Amylen zugesetzt worden war, gelegt waren, bildeten alle Eier sogleich eine Membran, dann kam es zur Cytolyse. Dies trat auch ein, wenn der unaufgelöste Teil dieser Substanzen sorgfältig entfernt war. Wenn jedoch 3 ccm einer $\frac{N}{10}$ Fett- oder Mineralsäure zugesetzt wurden, schwollen die Eier an, aber sie

bildeten weder eine Membran noch erlitten sie Cytolyse. Wenn die Eier früh genug in normales Seewasser versetzt wurden, bildeten sie gerade so gut eine Membran, als wenn sie der Säure allein ausgesetzt worden wären, obgleich ihr Volumen größer war und sie augenscheinlich gelitten hatten.

Der Zusatz von Formaldehyd, Aceton, Glycocoll, Leucin, ebenso wie der einer Anzahl von Salzen, verursachte in den ausgeführten Experimenten keine Membranbildung, so lange als die Konzentration des Seewassers nicht geändert wurde.

Die Frage, wie die einbasischen Säuren die Membranbildung verursachen, erfordert quantitative Bestimmungen, wovon ich bis jetzt nur wenige gemacht habe. Die für die Membranbildung erforderliche Mindestzeit der Einwirkung auf die Eier ist bei einer Temperatur von 20° C:

Für 4 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure + 50 ccm Seewasser, ungefähr 30 Sekunden;

für 3 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure + 50 ccm Seewasser, ungefähr 45 Sekunden;

für 2 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure + 50 ccm Seewasser, ungefähr 2 oder 3 Minuten;

für 1½ ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure + 50 ccm Seewasser, ungefähr 6 bis 7 Minuten.

Die Tatsache, daß ein Teil der Säure durch das Seewasser neutralisiert wird, muß für die Berechnung dieser Resultate in Betracht gezogen werden.

Es kann auch gezeigt werden, daß bei Überexposition keine Membran mehr gebildet wird, wenn die Eier in Seewasser zurückversetzt werden. Die Überexposition beginnt bei 20° C in einer Mischung von:

10 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure + 50 ccm Seewasser,
nach 45 Sekunden;

4 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure + 50 ccm Seewasser,
nach ungefähr $1\,^1/_2$ Minuten;

3 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure + 50 ccm Seewasser,
nach ungefähr 3 Minuten.

Die Eier, welche überexponiert waren, konnten nicht mit Samen befruchtet werden.

VI.

Es schien von Interesse zu sein, sich zu vergewissern, ob ein Unterschied für die parthenogenetische Entwicklung je nach der Substanz vorhanden war, die für die Erzeugung der Membran gebraucht wurde. Die Eier, bei welchen die Membranbildung durch Fettsäuren hervorgerufen war, gaben gute Embryonen, wenn sie nachher 30—50 Minuten lang hypertonischem Seewasser ausgesetzt wurden. Doch schien es, als ob die Embryonen der Eier, welche mit Buttersäure oder Valeriansäure behandelt worden waren, noch ein wenig besser wären, als die, welche mit Propionsäure oder Essigsäure behandelt worden waren. Ich habe besonders darauf geachtet, ob die Eier, bei welchem die Membranbildung durch eine Substanz

der ersten Gruppe hervorgerufen worden war, normale Embryonen lieferten. Wenn die Eier unmittelbar nach der Bildung der Membran aus dem Seewasser, welches Benzol enthielt, herausgenommen wurden, kam es nicht in allen Eiern, die eine Membran gebildet hatten, zu Cytolyse. Wenn diese Eier nachher in der oben beschriebenen Weise mit hypertonischem Seewasser behandelt wurden, teilten sie sich und einige von ihnen entwickelten sich zu Plutei. So bald die Bildung einer Membran durch eine Substanz, welche das Ei nicht allzusehr schädigt, herbeigeführt worden ist, kann die nachfolgende kurze Behandlung mit hypertonischem Seewasser zu der Bildung eines Embryo führen. In Bezug auf ihre Lebenskraft und möglicherweise in ihrer Struktur, können die Embryonen verschieden sein, je nach der Substanz, welche für die Erzeugung der Membran gebraucht wird. Dies muß jedoch durch weitere Experimente entschieden werden.

Alle in dieser und den vorhergehenden Mitteilungen erwähnten Tatsachen deuten an, daß der Prozeß der Membranbildung eine wesentliche und nicht eine Nebenerscheinung bei dieser Methode künstlicher Parthenogenese ist. Wenn Eier mit einer Fettsäure behandelt werden, aber nicht lange genug, um den Prozeß der Membranbildung hervorzurufen, oder mit einer Säure, welche für diesen Prozeß unpassend ist, z. B. Salpetersäure, wird auch eine nachfolgende Be-

handlung der Eier von 30 oder 50 Minuten mit hypertonischem Seewasser die Eier nicht veranlassen können, sich zu teilen oder zu entwickeln. Es darf jedoch nicht übersehen werden, daß auf den Prozeß der Membranbildung bei diesen Experimenten die Bildung einer Spindel folgt und daß diese zwei Erscheinungen bis jetzt nicht getrennt worden sind.

Vor fünf Jahren wagte ich die Vermutung auszusprechen, daß der Prozeß der Membranbildung ein Gerinnungsprozeß sei. Es ist jedoch klar, daß die Membranbildung in diesen Experimenten nicht einer Säuregerinnung zugeschrieben werden kann, da in diesem Falle die Membranbildung zustande kommen müßte, während die Eier in der Säure sind, und nicht nachdem sie herausgenommen sind. Überdies schließt die Tatsache, daß nur gewisse Säuren in dieser Weise wirken, eine solche Ansicht aus. Durch eine genauere Beobachtung des Prozesses der Membranbildung, neige ich zu der Ansicht, daß sie ein Absonderungsprozeß ist, d. h. das unter Druck stattfindende Auspressen einer Flüssigkeit aus dem Innern des Eies[1]). Ich bin nicht imstande die Natur der Kräfte, welche der Absonderung zugrunde liegen, in diesem oder in irgend einem anderen Falle darzulegen.

[1]) Loeb, diese Folgen, Bd. II, S. 73. Pflügers Archiv, Bd. 103, S. 257. 1904.

XVIII.

Künstliche Membranbildung und chemische Befruchtung bei einem Seestern (Asterina)[1].

1. Ich war stets der Ansicht, daß ein Verständnis des Befruchtungsmechanismus nur durch Entdeckung physikalisch-chemischer Methoden ermöglicht wird, die imstande sind, den Befruchtungsprozeß in allen seinen wesentlichen Einzelheiten nachzuahmen. Nur auf diese Weise ist es möglich, die wesentlichen und minder wesentlichen Vorgänge dieses Prozesses voneinander zu sondern. In drei früheren Mitteilungen[2]) stellte ich die Tatsache fest, daß die künstliche Erzeugung einer Membran bei dem Ei des Seeigels sehr wesentlich ist, wenn eine vollständige physikalisch-chemische Nachahmung des Befruchtungsprozesses beabsichtigt wird. Die Membranbildung kann bei dem Ei von Strongylocentrotus purpuratus durch zwei Gruppen von Substanzen erzeugt werden, die eine derselben

---

[1]) University of California publications Physiology. Vol. 2. Nr. 16. Sept. 12. 1905.

[2]) Loeb, diese Serie, vol. II, S. 83, 89 u. 113. 1905.

(Kohlenwasserstoffverbindungen, wie Benzol oder Amylen) wirken, während das Ei in Kontakt mit der Substanz ist; die andere (gewisse Säuren z. B. Fettsäuren) rufen die Membranbildung als eine Nachwirkung hervor, namentlich nach Überführung des Eies in normales Seewasser. Da das Spermatozoon ebenfalls eine Membranbildung an dem Ei hervorbringt so ist es möglich, wenn nicht sogar wahrscheinlich, daß das Spermatozoon seine befruchtende Kraft ganz oder teilweise einer Substanz verdankt, die einer oder beiden der erwähnten Gruppen angehört.

Vor zwei Jahren[1]) veröffentlichte ich eine Methode mittels welcher das Ei des Seeigels durch das Sperma jeder Art von Seesternen befruchtet werden kann. Diese Methode besteht darin, daß man Seewasser leicht alkalisch macht (oder seine Alkalinität über die natürlichen Grenzen erhöht). Wahrscheinlich ist diese Vermehrung der Alkalinität nur die Ursache dafür, daß das Seesternspermatozoon in das Protoplasma des Seeigeleies eindringen kann, es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß die vermehrte Alkalinität zur Vermehrung oder Modifizierung der Befruchtungskraft des Seesternsspermatozoons notwendig ist. Dies scheint aus zwei Tatsachen hervorzugehen. Einmal hat die Behandlung des Seesternspermas für sich mit alkalischem Seewasser wenig

[1]) Loeb, diese Serie, vol. I, S. 1, 39 u. 85. Pflügers Archiv, 1903, vol. 99, S. 323 u. 637. 1904, vol. 104, S. 325.

oder gar keine Wirkung, und zweitens kann sich das Seeigelei entwickeln, wenn es unmittelbar nach dem Eindringen des Seesternspermatozoons in normales Seewasser gebracht wird. Da der Eintritt des Seesternspermatozoons in das Seeigelei die Bildung einer Membran ebenfalls hervorbringt, hat es den Anschein, als wenn die Befruchtung des Seesterneies durch die gleichen oder ähnlichen Chemikalien verursacht wird, wie die Befruchtung des Seeigeleies. Ich habe kürzlich einige Versuche mit dem Seesternei zur Entscheidung dieser Frage gemacht und zwar mit dem Ei der Asterina aus der Bai von Monterey. Das Ei dieses Seesterns ist speziell für die Entscheidung der aufgeworfenen Frage geeignet, da es nach dem Eintritt des Spermatozoons eine Membran bildet.

2. In erster Linie war festzustellen, ob die Substanzen, welche die künstliche Membranbildung bei dem Seeigelei hervorrufen, auch in gleicher Weise auf das unbefruchtete Ei von Asterina einwirken. In der Tat ist dies der Fall, nur besteht der Unterschied, daß für Asterina eine höhere Konzentration der entsprechenden Lösung nötig ist als für Strongylocentrotus purpuratus [1]).

[1]) Ich will hier erwähnen, daß die Konzentration von Fettsäuren in Seewasser, welche für die Membranbildung notwendig ist, für die verschiedenen Arten von Seeigeln nicht die gleiche ist. Die Beifügung von 3 ccm $\frac{N}{10}$ Essig- oder Buttersäure zu 50 ccm Seewasser rief bei Strongylocentrotus purpuratus den Prozeß der Membranbildung nach einer Einwir-

Werden die reifen Eier von Asterina in 50 ccm Seewasser gesetzt, das mit 1 ccm Benzol oder Amylen geschüttelt wurde, so bilden alle sofort Membranen, die in ihrer Erscheinung gänzlich den nach dem Eintritt von Spermatozoen gebildeten Membranen gleichen. Werden die Eier indessen nicht unmittelbar nach der Membranbildung aus dem Benzol oder Amylen-Seewasser herausgenommen, so unterliegen sie der Cytolyse, d. h. sie schwellen an, der Inhalt bildet sich in Tröpfchen um, das Pigment verschwindet und das Ei wird zum typischen „Schatten". Analog der geläufigen Auffassung des Verlaufs dieses Prozesses an Blutzellen hätte man sich vorzustellen, daß das lipoide Oberflächenhäutchen durch das Benzol aufgelöst oder beschädigt wird. Indessen ist diese Auffassung noch nicht mit Sicherheit als bewiesen hinzustellen.

Wird an Stelle der Kohlenwasserstoffverbindungen eine Fettsäure angewendet, so bildet sich keine Membran, solange die Eier von Asterina sich in dem angesäuerten Seewasser befinden; doch wird die Membran sofort gebildet, nachdem die Eier wieder in normales Seewasser überführt worden sind, vorausgesetzt, daß die Periode der Säurewirkung weder zu kurz noch zu lang war. Wurden 5 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure 50 ccm

kung von $1^1/_2$ Minute hervor, während diese Konzentration der Säure bei Str. Franciscanus zu hoch war. Für letztere Form wurden 2 ccm $\frac{N}{10}$ Essig- oder Buttersäure zu 50 ccm Seewasser beigefügt.

Seewasser hinzugefügt, so bildete sich kein Membran, wenn die Eier weniger als $1^1/_2$ Minute (bei 18° C) in dieser Lösung verblieben. Wurden sie dagegen zwei Minuten in diesem angesäuerten Seewasser belassen, so bildeten sich Membranen nach der Überführung in normales Seewasser. Buttersäure, wie Kapronsäure gaben ähnliche, Salzsäure und Salpetersäure dagegen bis jetzt keine befriedigenden Resultate. In einigen Fällen wurden Membranen nach der Überführung der Eier aus den Mineralsäuren in normales Seewasser gebildet, aber sie waren den durch Spermatozoen oder aus Butter- oder Kapronsäure erzeugten nicht gleich und geringer an Zahl.

Das Ei des Seesterns ist in der Regel noch nicht reif, wenn es aus dem Eierstock hervorgeht, wird es aber in Seewasser gebracht, so erfolgt die Reifung in sehr kurzer Zeit, ungefähr in zwei Stunden oder selbst weniger. Das unreife Ei hat einen großen Kern. Der Reifeprozeß kündet sich zuerst durch die Tatsache an, daß dieser Kern weniger sichtbar wird (durch teilweise Auflösung in dem Protoplasma des Eies). In der Folge werden die Polkörperchen ausgestoßen, das Ei enthält dann einen Kern, der wesentlich kleiner ist als der ursprüngliche. Wird den Eiern Sperma zugefügt zu einer Zeit, in der der große ursprüngliche Kern noch sichtbar ist, so wird keine Membran gebildet, solche unreife Eier können also nicht befruchtet werden und sich nicht ent-

wickeln. Nur wenn der Kern unsichtbar geworden oder wenigstens schon reduziert ist, hat Sperma Wirkung. Ein Versuch, mit Buttersäure und Benzol Membranbildung bei dem unreifen Ei von Asterina zu erzeugen, hatte keinen Erfolg. Nur nachdem der große Kern unsichtbar geworden, kann der Prozeß der künstlichen Membranbildung zustande kommen. Die Zeit, in der dies möglich ist, ist die gleiche für die Wirkung der Buttersäure sowohl wie der Spermatozoen. Erwähnt sei, daß auch bei meinen früheren Versuchen an Seeigeleiern sich gezeigt hat, daß bei unreifen Eiern die natürliche wie die künstliche Membranbildung unmöglich ist. Es scheint, als ob einige der in dem unreifen Kern enthaltenen Substanzen in das Ei diffundieren müssen, bevor dasselbe zu einer Membranbildung fähig ist. Es stimmt dies mit der von Delage entdeckten Tatsache überein, daß entkernte Fragmente des Seesterneies mit Sperma nicht befruchtet werden konnten, wenn dasselbe nicht vorher den Reifungsprozeß durchgemacht hatte.

3. Unsere früheren Veröffentlichungen über eine verbesserte Methode künstlicher Parthenogenese von Seeigeleiern haben gezeigt, daß die Membranbildung bzw. der Prozeß, welcher diese bewirkt, ein wesentlicher Teil des normalen Befruchtungsprozesses ist ebensowohl, wie einer vollständigen physikalisch-chemischen Nachahmung dieses Prozesses.

Ist nun dies auch bei dem Seestern der Fall? Zur Entscheidung darüber müssen wir das Verhalten der Eier von Asterina, bei welchen die Membranbildung durch künstliche Mittel hervorgerufen wurde, mit dem Verhalten solcher Eier vergleichen, bei welchem es zu keiner Membranbildung kam. Bevor wir diese Differenz feststellen, wird es gut sein, sich der Tatsache zu erinnern, daß die Eier des Seesterns in wesentlichen Punkten sich von den des Seeigels, Strongylocentrotus und Arbacia unterscheiden. Die Seesterneier zeigen eine schwache Tendenz sich freiwillig ohne äußeren Einfluß zu entwickeln. Wir können den Unterschied teilweise, aber auch nur teilweise, zum Ausdruck bringen, wenn wir sagen, daß das reife Ei von Asterina sich in einem ähnlichen Zustand befindet, wie Eier von Strongylocentrotus purpuratus, die $1^1/_2$—2 Stunden mit hypertonischem Seewasser behandelt wurden. Ich fand nämlich, daß unter solchen Bedingungen von den Eiern des Strongylocentrotus purpuratus sich mitunter überhaupt keine, manchmal dagegen 1%, manchmal sogar noch mehr entwickeln. Die Entwicklung geschah in allen Fällen nicht so rasch und so vollständig wie bei befruchteten Eiern der gleichen Art. Wurden aber die gleichen Eier nachher mit einer Fettsäure in derselben Weise wie bei der Membranerzeugung behandelt, so pflegte sich ein großer Prozentsatz zu entwickeln und bei einer gewissen Anzahl war die Entwicklung ebenso rasch

und von dem gleichen Typus wie bei den befruchteten Eiern.

Kommen die Eier von Asterina im Seewasser zur Reifung und überläßt man sie weiter sich selbst, so werden manchmal keine, manchmal ein Bruchteil von einem Prozent, manchmal noch mehr sich furchen und zu Larven entwickeln. Doch ist die Entwicklung viel langsamer als bei befruchteten Eiern und in der Regel sind die Larven nicht so vollkommen und sterben früher. Werden die Eier indessen mit Butter- oder Kapronsäure (oder auch mit Benzol) behandelt, um eine Membranbildung ohne Verletzung herbeizuführen, so kann eine Entwicklung hervorgerufen werden, die in jeder Beziehung mit der durch den Eintritt von Spermatozoen bewirkten identisch ist. In der Regel entwickeln sich nicht alle Eier, welche Membranen bilden, in dieser Weise. Eine Anzahl (verschieden in verschiedenen Versuchen) gehen in normaler Zeit nicht in das 2-Zellenstadium über, sondern bleiben oft bis zu fünf Stunden untätig (bei einer Temperatur von 18° C). In einem Falle begannen die Eier eines Weibchens zwischen 10 Uhr 30 und 10 Uhr 40 Minuten vormittags ihre Polkörperchen auszustoßen. Zu dieser Zeit wurde ein Teil der Eier mit Sperma befruchtet, während ein anderer $^1/_2$—$1^1/_2$ Minute der Wirkung einer Mischung von 6 ccm $\frac{N}{10}$ Buttersäure + 50 ccm Seewasser ausgesetzt wurde. In beiden Gruppen bildeten alle Eier — wenige unreife ab-

gerechnet — eine typische Befruchtungsmembran. In etwa zwei Stunden gingen alle mit Sperma befruchteten Eier in Zweiteilung über und ungefähr gleichzeitig fingen etwa 10% der mit Buttersäure behandelten ebenfalls an, sich zu furchen. Sie setzten dies fort, allerdings sichtlich schwächer als die mit Sperma befruchteten Eier; die Furchungszellen waren indessen gleich vollkommen in beiden Gruppen. Fünf Stunden nach der Behandlung mit Buttersäure, beziehentlich der Beifügung von Sperma, war die Situation folgende: Die mit Sperma befruchteten Eier waren alle in dem 16-Zellenstadium. Von den mit Buttersäure behandelten waren nur 10% gefurcht; diese befanden sich im 8- oder 16-zelligen Stadium. Der Rest war absolut unsegmentiert und zeigte keine Veränderung. Sehr bald nachher trat jedoch eine Veränderung bei diesen ein. Kleine klare Tröpfchen wurden unregelmäßig an verschiedenen Stellen an der Oberfläche des Protoplasmas gebildet und die Eier zerfielen langsam in eine Menge klarer Tropfen. Oft unterlag nicht das ganze Ei, sondern nur ein Teil diesem Prozeß. Zeitweilig glichen diese Eier sehr solchen im 64-Zellenstadium, nur mit dem Unterschied, daß die einzelnen zellgleichen Tröpfchen unregelmäßiger verstreut waren als in dem normal entwickelten Ei. Das Verhalten der zwei Gruppen von Eiern, war übrigens ein verschiedenes. Das normal gefurchte, durch Buttersäure oder mit Sperma befruchtete

Ei, entwickelte sich am folgenden Tag zu einer schwimmenden Blastula, die in beiden Fällen gleich ausgebildet war. Die Buttersäure-Eier indessen, welche sich nicht furchten, aber die Tröpfchenbildung (Myelinbildung) zeigten, wurden schwarz und starben am nächsten Tag. Von den Eiern, von welchen nur ein Teil diesen Prozeß der Tröpfchenbildung mitmachte, wurde nur dieser Teil bis zum folgenden Morgen schwarz.

Die gleichen Beobachtungen wurden an Eiern von Asterina gemacht, bei welchen die Membranbildung durch Benzol bewirkt worden war. Ein Teil derselben entwickelte sich gleich normal befruchteten Eiern, während der andere dem Prozeß der Auflösung unterlag. Die Verhältniszahlen der normal entwickelten und zerfallenden Eier waren in den verschiedenen Versuchen sehr wechselnd, doch konnte ich einen Grund dafür nicht finden.

Der Leser wird die Analogie zwischen den Beobachtungen an Asterina und den früheren bei Strongylocentrotus bemerkt haben. Wurden die Eier des Seeigels dem Prozeß der Membranbildung unterworfen, ohne frühere oder spätere Behandlung mit hypertonischem Seewasser, so setzte nach ungefähr 5—6 Stunden ein Auflösungsprozeß ein, der auch mit Bildung von kleinen klaren Tröpfchen begann. Wurde dagegen vor oder nach der künstlichen Membranbildung die Behandlung mit hypertonischem Seewasser entsprechend lange vorgenommen, so fand Ent-

wicklung wie bei normal befruchteten Eiern statt. Die Beendigung der Laichzeit hinderte mich den einfachen Versuch zu machen, ob die Eier von Asterina, welche sechs Stunden nach der Membranbildung zerfallen, sich entwickeln, wenn sie eine entsprechende Zeit lang einer Behandlung mit hypertonischem Seewasser unterworfen werden.

Für den Seeigel wurde folgendes gefunden. Wenn Eier mit Säure oder Benzol behandelt waren, aber nicht lange genug, um eine Membranbildung bei allen Eiern zu bewirken, so wiesen diejenigen, welche keine Membran gebildet, fast niemals einen normalen Entwicklungsgang auf, auch wenn sie vor- oder nachher hypertonischem Seewasser ausgesetzt wurden. Es war von Interesse, das entsprechende Experiment mit Asterina zu machen. Dazu wurden die Eier in eine Mischung von 5 ccm $\frac{N}{10}$ Essigsäure + 50 ccm Seewasser, $^1/_2$, 1 und $1^3/_4$ Minuten lang gebracht. In den ersten beiden Portionen bildete sich kein Membran, in der dritten dagegen in ungefähr 10%. Von letzteren Eiern furchten sich beinahe alle normal und entwickelten sich zu typischen normalen Blastulae und Gastrulae, etwa in demselben Verhältnis wie bei befruchteten Eiern. Diejenigen Eier, welche eine Membran gebildet hatten, aber nicht anfingen sich regelmäßig zu furchen, zeigten nach einiger Zeit die oben erwähnte eigenartige Zersetzung. Von den Eiern, die eine Membran überhaupt nicht gebildet hatten, furchte sich nur ein geringer

Prozentsatz regelmäßig, doch war die Furchung stets verzögert gegenüber der Furchung solcher Eier, die eine Membran gebildet hatten. Es kam bei membranlosen Eiern auch stets nur zur Bildung von kleineren Blastulae. Die Zahl der gebildeten Blastulae aus membranlosen Eiern war am kleinsten in der Portion, welche der Säure nur $^1/_2$ Minute ausgesetzt war. Etwa $^1/_4$% derselben bildeten Blastulae. Von den Eiern der zweiten Portion, die der Säure eine Minute ausgesetzt waren, bildeten etwa 5% Blastulae. In der dritten Portion wurde eine noch größere Zahl von Blastulae gefunden, und es war leicht der Unterschied der Blastulae zu erkennen, die aus Eiern mit oder ohne Membranbildung stammten. Die ersteren begannen viel eher zu schwimmen als die letzteren. Von den Eiern, welche weder ein Membran gebildet, noch sich gefurcht hatten, waren beinahe alle tot und hatten ein dunkles, beinahe schwarzes Aussehen statt der hellgelben Farbe der lebenden Eier. Einige hatten sich unter Tröpfchen- oder Myelinbildung aufgelöst, die meisten jedoch nicht.

Unter den Kontrolleiern, welche in normalem Seewasser belassen wurden, zeigten nur wenige etwas Neigung sich zu furchen — und zwar sehr langsam — während der Rest in weniger als 24 Stunden zugrunde ging und schwarz wurde.

Wir haben somit unter diesen Eiern zwei Entwicklungstypen. Der eine wird durch die befruchteten

Eier dargestellt, zugleich kann er künstlich durch Hervorrufen einer Membranbildung mit den oben erwähnten künstlichen Mitteln erzeugt werden. Der zweite Typus wird durch die sich spontan entwickelnden Eier dargestellt, in welchen eine Membranbildung nicht hervorgerufen wurde. Diese Eier beginnen erst später sich zu furchen, sie entwickeln sich langsamer als die anderen Eier und bilden Larven, die nicht so vollkommen sind, wie die des ersten Typus. Die Zahl der Eier, welche die Entwicklung der zweiten Gruppe durchmachen, kann dadurch vermehrt werden, daß man die Eier für einige Zeit in gesäuertes Seewasser bringt, auch wenn diese Behandlung zu keiner Membranbildung führt. Diese Tatsache ist schon früher durch Versuche Neilsons und von mir selbst und von Delage festgestellt worden. Ich bin geneigt zu glauben, daß für weitere Versuche in dieser Richtung, speziell wenn eine Aufzucht von Larven beabsichtigt ist, die Larven des ersten Typus vorzuziehen sind, wenigstens soweit Asterina in Betracht kommt.

Für Strongylocentrotus bemerke ich, daß höhere Fettsäuren, wie Butter-, Valerian-, Kapronsäure bessere Larven erzielen als Essigsäure. Dasselbe scheint auch bei Asterina der Fall zu sein.

Aus all den hier erwähnten Tatsachen habe ich den Eindruck gewonnen, daß die Membranbildung, oder vielleicht nur der innere Vorgang der zu derselben führt, ein wesentlicher Bestandteil des Befruchtungs-

prozesses ist, sowohl bei Seeigeln wie bei gewissen Seesternen z. B. Asterina. Es mag pedantisch sein, zwischen der Bildung der Membran und dem Vorgang, der diese bedingt, zu unterscheiden: doch wurde diese Unterscheidung durch eine von mir aufgestellte Vermutung veranlaßt, daß die Membranbildung das Resultat der Sekretion einer Flüssigkeit aus dem Ei sein möchte, daß daher diese Sekretion oder das Heraustreten gewisser Substanzen aus dem Ei der wesentliche Vorgang sein könnte, während die eigentliche Membranbildung nur die mechanische Folge dieser Sekretion, aber an sich ohne Bedeutung wäre. Diese Meinung wird durch die Tatsache gestützt, daß unter gewissen Bedingungen das Ei des Seeigels befruchtet werden kann, ohne fähig zu sein, eine Membran zu bilden. Vor einigen Jahren fand ich, daß das Ei des Seeigels (Arbacia), wenn es in sterilisiertes Seewasser, frei von Bakterien, gebracht wird, befruchtet werden kann, wenn es darin eine Woche oder noch länger belassen wird. Wurden nun die Eier diesen Bedingungen länger als 48 Stunden (bei Sommertemperatur) ausgesetzt, so bildeten sie nach dem Eintritt des Spermatozoons keine Membran mehr, wenn auch ihre Entwicklung in jeder andern Beziehung ganz normal war[1]).

4. Die folgenden Tatsachen dürften gleichfalls wohl für eine Erörterung über die Natur des Befruchtungs-

[1]) Loeb, Pflügers Archiv, vol. 93, S. 59. 1902.

prozesses von Interesse sein. In einer früheren Schrift habe ich gezeigt, daß der Furchungsprozeß des Eies von Arbacia (und anderer Tiere) von dem Vorhandensein von freien Sauerstoff abhängt, und daß die Verdrängung der Luft durch Wasserstoff den Prozeß sehr rasch, wenn nicht unmittelbar zum Stillstand bringt[1]). Es ist sonach zweifellos, daß Oxydationsprozesse für die Entwicklung des Eies Vorbedingung sind[2]).

Vor drei Jahren machte ich auf die Tatsache aufmerksam, daß die Reifung das Seesternei in eine kritische Lage bringt, in der zwei Möglichkeiten gegeben sind: Entweder tritt eine Ursache ein, welche das Ei wenig Stunden nach der Reifung zur Entwicklung bringt, in welchen Fall es leben bleibt, — oder aber es tritt keine Entwicklung ein, dann stirbt das Ei sehr rasch. Ich konnte zeigen, daß dieser rasche Tod nur in Gegenwart von Sauerstoff zustande kommt. Ich hatte kürzlich Gelegenheit diese Beobachtungen bei Asterina zu bestätigen. Wurden die Ovarien von Asterina in ein Gefäß mit Wasser gebracht und wurde dann den Eiern Gelegenheit gegeben, die Ovarien zu verlassen und ohne mechanische oder sonstige Störung im Seewasser zu bleiben, so finden wir nach 24 Stunden oder weniger, folgende drei Typen von Eiern: Erstens unreife Eier mit großem nicht reduzierten Kern, die lebend sind und noch länger leben;

[1]) Pflügers Archiv, vol. 62, S. 249. 1895.
[2]) Ebenda, vol. 93, S. 59. 1902.

zweitens reife Eier, entwickelt und somit auch lebend; und drittens reife Eier, die sich nicht entwickelt haben, und tot und schwarz sind. Ich habe wiederholt die Tatsache festgestellt, daß dieser Prozeß des Absterbens gleich wie der der Entwicklung, von dem Vorhandensein von Sauerstoff abhängt. Wo atmosphärischer Sauerstoff freien Zutritt hat, starben die Eier rasch, außer wenn sie zur Entwicklung gebracht worden waren; hat dagegen der Sauerstoff keinen Zutritt, so bleiben die Eier am Leben. Liegen die Eier in einem Uhrglas dicht und in mehreren Lagen übereinander, so werden die reifen Eier in der obersten Lage, welche sich nicht entwickeln, aufgelöst und schwarz gefunden, während in den unteren Schichten, wohin der Sauerstoff nicht oder nur unvollkommen dringen kann (wegen der Absorption durch die oberen Schichten der Eier), die reifen und nicht entwickelten Eier weder zerfallen noch sich verfärben. Man kann nicht sagen, diese Eier seien beim Beginn des Versuches schon sterbend gewesen und deshalb unfähig sich zu entwickeln; im Gegenteil, es kann positiv gezeigt werden, daß diese Eier sterben, weil sie nicht veranlaßt wurden, sich in der kritischen Periode der Reifung zu entwickeln. Es kann dies durch folgende Tatsache bewiesen werden. Wenn die Eier des gleichen Weibchens in drei Portionen geteilt werden, von denen eine mit Sperma, die andere chemisch befruchtet wird, die dritte ganz unberührt bleibt,

so entwickeln sich alle Eier der ersten Portion und ebenso alle oder ein großer Teil der zweiten, und diese Eier sind die nächsten und die folgenden Tage lebend, dagegen sind die Eier der dritten Portion alle tot mit Ausnahme eines wechselnden aber stets kleinen Prozentsatzes solcher, die sich spontan entwickeln. Es ist also unzweifelhaft, daß Oxydationsprozesse in beiden Fällen stattfinden, sowohl beim reifen unbefruchteten oder ruhenden Seesternei, wie beim befruchteten oder sich entwickelnden Ei. Während aber in letzterem Fall die Wirkung des Sauerstoffs zur Entwicklung führt, ist sie für das unbefruchtete Ei die Todesursache. Daraus dürfen wir die Folgerung ziehen, daß der Oxydationsprozeß in dem reifen Seesternei zur Bildung verschiedener chemischer Produkte führt, je nachdem Befruchtung und Entwicklung eintritt oder unterbleibt.

Das befruchtete Ei ist durchaus aërob, das reife unbefruchtete oder sich nicht entwickelnde des Seesterns wird anaërob; für dieses ist Sauerstoff ein Gift.

Es kann in der Tat gezeigt werden, daß die bei einem reifen nicht entwickelten Ei vorkommenden chemischen Prozesse ganz verschieden von den des befruchteten oder sich entwickelnden Eies sein müssen. Die hauptsächliche Wirkung des Eindringens eines Spermatozoons, wie die der chemischen Befruchtung auf das Ei, ist die Eröffnung einer Reihe von Zellteilungen. Vom physiologischen Gesichtspunkt be-

trachtet, scheint dieser Prozeß hauptsächlich in der Umbildung von Protoplasma in Kernmasse zu bestehen. Nach der ersten Kernteilung ist die Masse der Chromosomen in jedem der beiden Kerne die Hälfte des ursprünglichen Kernes. Dann wachsen die Chromosomen der beiden Kernteile bis die Masse des Chromatins in jedem der des ursprünglichen Kerns gleich ist; dann erfolgt eine weitere Teilung der Kerne — jetzt also in vier. Dieser Prozeß wiederholt sich bis ein bestimmtes Verhältnis zwischen Chromatinmasse und dem Protoplasma erreicht ist, worauf die Zellteilung aufhört. Dies hat Boveri bewiesen. Er zeigte, daß bei einer gewissen Art von Seeigeln die endliche Größe der Blastomeren stets im Verhältnis zur Chromatinmasse des ursprünglichen Kerns[1]) steht. Es ist zweifellos, daß die Spermatozoenwirkung auf das Ei in der Anregung zur Umbildung von Protoplasma in Kernmaterial besteht. Der Umstand, daß dieser Prozeß zum Stillstand kommt, wenn die Masse der Chromosomen zum Protoplasma in ein bestimmtes Verhältnis gebracht ist, das, wie Beobachtungen von Sachs, Boveri u. a. zeigen, konstant für jede Spezies ist, legt den Gedanken nahe, daß es sich bei dieser Umwandlung um eine Art umkehrbaren Prozesses handelt. Die Furchung hört auf, wenn ein Gleichgewichtszustand zwischen dem Chromosomenmaterial des Kerns und den Protoplasmaverbindungen, welche das-

[1]) Boveri, Zellenstudien. Heft 5, Januar 1905.

selbe bilden, erreicht ist. Die Tatsache, daß das Wachsen der Kernmasse und die Verminderung des Protoplasma nicht fortlaufend, sondern periodisch ist und durch die Vorgänge der Kern- und Zellteilungen unterbrochen wird, ändert diese Auffassung nicht. O. Hertwigs Versuche zeigen, daß der Einfluß der Temperatur auf die Art und Weise der Entwicklung des Froscheies ähnlich demjenigen ist, den van't Hoff und Arrhenius bezüglich der Geschwindigkeit chemischer Reaktionen gefunden haben.

Die Prozesse der Kern- und Zellteilung könnten sekundäre Wirkungen sein, abhängend von der Tatsache, daß das Wachstum des Chromosoms begrenzt ist, und daß, sobald diese Grenze erreicht wird, andere Prozesse, welche zur Teilung der Chromosomen führen, angeregt werden. Wenn diese Teilung vorüber ist, sind die Chromosomen wieder fähig zu wachsen.

Wir wissen nicht wie das Spermatozoon diesen Prozeß der Umwandlung des Protoplasmas des Eies in das Kernchromatin anregt oder beschleunigt. Möglich ist, daß etwas in das Ei hineinbringt, z. B. eine positiv katalytische Substanz, die diesen chemischen Prozeß direkt anregt oder beschleunigt. In dem Falle wäre es schwer zu verstehen, wie die künstliche Membranbildung teilweise wie ein Spermatozoon wirken kann. Eine zweite Möglichkeit wäre, daß das Spermatozoon eine negativ katalytische Substanz zerstört oder aufhebt, oder einen Zustand des Eies beseitigt,

welcher die Umbildung von Protoplasma in Kernmaterial verhindert oder verzögert. Wäre dies wirklich der Fall, so könnte man wohl begreifen, daß die Sekretion, welche die Membranbildung bedingt, die Entwicklung so wirksam in Gang zu bringen vermag. Wäre die erste Ansicht richtig, daß nämlich die Tätigkeit des Spermatozoons darin besteht, eine positiv katalytische Substanz in das Ei zu bringen, so müßte es uns auch möglich sein, das unbefruchtete Ei allein durch die Erhöhung der umgebenden Temperatur zur Entwicklung zu bringen, da dadurch die Reaktionsgeschwindigkeit chemischer Prozesse ebenfalls vermehrt wird. Während aber eine höhere Temperatur die Entwicklung des Eies beschleunigt, nachdem es befruchtet ist, war ich bis jetzt nicht imstande, auf diesem Weg die Entwicklung des unbefruchteten Eies anzuregen, obwohl ich wohl hoffen darf, in der Zukunft mehr Erfolg zu haben.

Wie nun auch die Entscheidung darüber ausfallen mag, so bleibt jedenfalls wahr, daß Oxydationen zu ganz verschiedenen Resultaten führen, je nachdem sie auf das sich entwickelnde oder das unentwickelte reife Seesternei wirken. Es ist möglich, daß in dem sich entwickelnden Ei der Sauerstoff bei der Synthese des Chromatin aus Protoplasma aufgebraucht wird, während in dem reifen aber sich nicht entwickelnden Ei derartige synthetische Prozesse nicht zustande kommen.

XIX.

Über eine chemische Methode, durch welche Molluskeneier (Lottia gigantea) zur Reife gebracht werden können [1].

1. Vor zwei Jahren veröffentlichte ich die Tatsache, daß ich imstande war, Larven aus unbefruchteten Eiern von gewissen Schnecken (Acmaea, Lottia gigantea) zu erzeugen, indem ich dieselben während ungefähr zwei Stunden in hypertonisches Seewasser von einer bestimmten Konzentration brachte. Dagegen war ich nicht imstande Larven durch Befruchtung der Eier der gleichen Weibchen mit Sperma zu erzielen. Kurz darauf kam ich auf meine neue Methode künstlicher Parthenogenese und versuchte sie auch an Schnecken, besonders bei Lottia gigantea. Wenn dabei die Be-

[1] University of California publications. Physiology. Vol. 3. 17. November, 1905.

Durch die Freigebigkeit des Dr. Morris Herzstein von San Francisco ist ein Marine-Laboratorium für biologische Untersuchungen in New-Monterey, Cal., erbaut und ausgerüstet worden. Die Arbeit der Physiolog. Abteilung wird durch Rudolph Spreckels Laboratorium im Berkeley und durch das Herzsteinsche Untersuchungs-Laboratorium in New-Monterey zusammen betrieben werden.

handlung mit hypertonischem Seewasser allein nicht zur Bildung von parthenogenetischen Larven von Lottia führte, so geschah das in den meisten Fällen bei einer Verbindung der Behandlungsweise der Eier des gleichen Weibchens mit hypertonischem Seewasser und Fettsäure. In der Regel verfuhr ich in folgender Weise:

Ich setzte die Eier $1^1/_2 - 2$ Stunden in eine Mischung von 100 ccm Seewasser und 17 ccm $2^1/_2$ n KCl oder NaCl und dann fünf bis zehn Minuten nachher zwei bis drei Minuten in eine solche von 50 ccm Seewasser und 3 ccm $\frac{n}{10}$ Butter-, Valerian- oder Kapronsäure. Die Zahl der sich entwickelnden Eier blieb dabei stets eine kleine, nur wenige Prozent. Die Furchung der entwickelten Eier war völlig regelmäßig, die Larven aber lebten in der Regel nicht länger als zwei Tage. Dann begann die Auflösung in mehrere Fragmente, meist schon am ersten Tage. Um den Unterschied dieser Entwicklungsstadien gegenüber normal entwickelten, aus befruchteten Eiern stammenden Larven zu finden, versuchte ich zu verschiedenen Zeiten, vom April bis Ende Oktober, die Eier der Lottia mit Sperma zu befruchten. Während ich aber mit künstlicher Parthenogenese bei den Eiern von Lottia stets Erfolg hatte, gelang es mir niemals, die Eier mit Sperma zu befruchten. Gewöhnlich war von Tausenden eines zu bemerken, das sich nach der Spermabeifügung entwickeln zu wollen schien. Die

resultierende Larve war aber immer unvollkommen und von keiner besseren oder sogar von geringerer Lebensfähigkeit als die parthenogenetischen Larven.

2. Der Umstand, daß die Eier mit Sperma nicht befruchtet werden konnten, ließ an die Möglichkeit denken, daß die Reifung nicht vollendet war. Statt nun länger auf die Periode der Reifung zu warten, entschloß ich mich, zu versuchen, ob es nicht möglich wäre, die Eier durch künstliche Mittel dazu zu bringen. Dazu legte ich dieselben in eine Mischung von 50 ccm Seewasser und 0, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25 und 1,5 $\frac{n}{10}$ NaHO und fügte jedem Gefäß die gleiche Menge Sperma bei. Keines der in normalem Seewasser befindlichen Eier furchte sich oder ergab eine Larve. Wenige Eier wurden in der Mischung von 50 ccm Seewasser + 0,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO befruchtet, besser entwickelten sich die Eier in der Mischung: 0,75 ccm NaHO, und ein sehr großer Prozentsatz wurde in 50 ccm Seewasser + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO befruchtet. Eier, die ohne Beifügung von Sperma in der gleichen Lösung belassen wurden, furchten sich nicht und bildeten ebensowenig Larven. Wurde die gleiche Säuremenge (HCl oder CH_3COOH) dem Seewasser beigefügt, so wurden die Eier nicht befruchtet. Es ist somit zweifellos, daß Eier von Lottia nicht in normalem oder angesäuertem Seewasser, wohl aber in alkalischem leicht befruchtet werden können.

3. Die nächste Frage war nun, ob das alkalische Seewasser durch eine Änderung des Eies, des Spermatozoons oder beider die Befruchtung hervorbrachte. Es konnte gezeigt werden, daß das Alkali die Befruchtung durch Einwirkung auf das Ei ermöglichte. Wurden die Eier vier bis sechs Stunden in einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 1 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO gelegt und nachher in normales Seewasser, dem Sperma beigefügt war, zurückgebracht, so wurden gerade so viel — d. h. nahezu alle — Eier befruchtet, wie wenn Sperma den Eiern in dem alkalischen Seewasser zugesetzt wurde. Wenn andererseits das Sperma in alkalisches Seewasser gebracht und nachher Eiern, die sich in normalem Seewasser befunden hatten, zugesetzt wurde, so kam nicht ein einziges Ei zur Entwicklung. Es ist somit zweifellos, daß das Ei in dem alkalischen Wasser einer Veränderung unterliegt, durch welche es zur Befruchtung reif wird. Diese Folgerung wurde durch die mikroskopische Untersuchung der Eier unterstützt. Die im normalen Seewasser gelassenen, nicht befruchtbaren Eier hatten einen unregelmäßigen Umriß und waren von einer Zottenhaut umgeben. Die Eier, die lange genug in alkalischem Seewasser verweilt hatten und befruchtet werden konnten, waren kugelförmig geworden und hatten ihre Zottenhaut verloren. Diese Veränderungen gingen nur im alkalischen, nie aber im normalen Seewasser vor sich. Hatten die Eier im

ersteren ihre Reife erhalten, so behielten sie natürlich diesen Zustand bei, wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht wurden und dort verblieben.

4. War dieser Einfluß des alkalischen Wassers auf die Reifung des Eies eine chemische oder physikalische Wirkung? Der Temperatureinfluß auf die Schnelligkeit des Reifungsprozesses macht eine Entscheidung möglich. Wir wissen, daß eine Zunahme der Temperatur die Schnelligkeit chemischer Reaktionen vergrößert. Diese Wirkung der Temperatur ist eine schnellere als die auf irgend eine physikalische Eigenschaft. Eier desselben Weibchens wurden in zwei Gefäße mit je 50 ccm Seewasser + 1 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO gesetzt; das eine wurde bei einer Temperatur von 18° C, das andere bei einer solchen von 8° C gehalten. In verschiedenen Zwischenräumen wurden einige Eier aus jedem Gefäß herausgenommen, in normales Seewasser von 18° C gebracht und Sperma zugesetzt. Es ergab sich, daß der Reifungsprozeß etwa zweimal so rasch bei 18° C vor sich ging als bei 8° C. Die einzelnen Eier eines Weibchens reifen nicht gleichförmig rasch im alkalischen Seewasser; die Zahl der Eier, welche befruchtet werden kann, nimmt nur nach und nach zu, bis endlich alle reif sind. Überdies ist es möglich, daß die Eier, deren Reifungsprozeß im alkalischen Seewasser einen gewissen Grad erreichte, denselben in normalem Seewasser, wenn auch langsam, vollenden können. Zunächst bestimmte ich

die Zeit, welche die Eier in dem alkalischen Seewasser verbleiben mußten, damit Befruchtung möglich wurde. Ich gebrauchte eine Lösung von 50 ccm — 1 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO. Die in einem Versuche gefundene Zeit betrug für Eier bei 19° Temperatur 40 Minuten, bei 8° 105 Minuten. Am folgenden Tage wurde das Zahlenverhältnis der Larven in den zu verschiedenen Zeiten herausgenommenen Portionen der Eier festgestellt. Es ergab sich folgendes Resultat:

Dauer der Einwirkung von alkal. Wasser	Zahl oder Prozentsatz der Larven in einem Uhrglas mit Eiern gefüllt	
	bei 18°	bei 8°
40 Minuten	1 Larven	— Larven
55 „	ca. 6 „	— „
83 „	ca. 12 „	— „
105 „	10%	2 „
130 „	40%	ca. 6 „
205 „	über 50%	ca. 12 „
270 „	„ 75%	5%
315 „		10%

Ich lege keinen Wert auf die Beobachtungen, bei denen nur wenige, ein halbes oder ganzes Dutzend Larven in einem mit Eiern gefüllten Glase gefunden wurden, da eine einzelne Larve leicht übersehen werden konnte. Bemerkenswert aber ist, daß während ungefähr 10% der Eier nach einem Aufenthalt von 105 Minuten in alkalischem Seewasser von 18° reiften, der gleiche Prozentsatz bei 8° erst nach ca. 315 Minuten

erreicht wurde. Die zum Vergleich gewählten Temperaturen sind nicht extrem und bleiben in den Grenzen, in denen Leben und Entwicklung normal sind. Keines der Kontrolleier, das sich in normalem Seewasser von 18° befand, konnte befruchtet werden. Es scheint deshalb, daß die Wirkung des alkalischen Seewassers für die Reifung des Eies von Lottia chemischer und nicht physikalischer Natur ist.

5. Es kann fernerhin leicht gezeigt werden, daß Sauerstoff für die Reifung der Eier von Lottia in alkalischem Seewasser nötig ist. Eier des gleichen Weibchens wurden in drei Portionen geteilt; eine wurde zur Kontrolle in normales Seewasser, die beiden anderen jede in 50 ccm Seewasser + 1,1 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO gesetzt. Eine dieser letzteren Lösungen wurde vier Stunden einem Strome von Wasserstoff ausgesetzt. Nach dieser Zeit kamen die Eier in alkalisches, Sauerstoff enthaltendes, Seewasser; alle reiften, und entwickelten sich nach Beifügung von Sperma zu Larven. Beim Fehlen des Sauerstoffes blieben alle unreif und keines entwickelte sich nach der Beifügung von Sperma. Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, und hierbei besondere Vorsicht gebraucht, um den Wasserstoff, bevor er durch das die Eier enthaltende Seewasser ging, zu reinigen, so daß er frei von jeder Spur von Säure war. Ich überzeugte mich selbst durch Titrierung, daß diese Fehlerquelle vermieden war. Von den im normalen Seewasser verbliebenen Eiern kam

keines zur Befruchtung, obgleich sie nach 24 Stunden den Anfang einer Reifung erkennen ließen.

Ein einfacherer Weg, den Einfluß des Sauerstoffs auf die Reifung ersichtlich zu machen, war der, eine Lage von Eiern auf den Boden einer langen Röhre, die mit alkalischem Seewasser gefüllt und fest verschlossen war, zu bringen. Wurden die Eier in einer solchen Röhre fünf Stunden belassen, so wurden keine oder nur sehr wenige reif und befruchtungsfähig gefunden, während die Eier vom gleichen Weibchen in der gleichen alkalischen Lösung, aber in einem flachen Gefäß und in einer sehr dünnen Schicht belassen, fast alle reiften und nach der gleichen Zeit befruchtet werden konnten.

6. Da es möglich war, daß die HO-Ionen katalytisch wirkten, erwartete ich, daß die Eier von Lottia auch in normalem Seewasser reiften, wenn sie lange genug darin belassen wurden. Während dies wahrscheinlich richtig ist, kamen in den Versuchen trotzdem die Eier nicht zur Reifung. Ich habe dies weiter versucht und sie 48 Stunden in normalem Seewasser belassen, einige auch bei 25° sechs Stunden lang, nie kam es zur Reifung. Die Eier erhielten gewöhnlich nach 24 Stunden eine runde Form und begannen die Zottenhaut zu verlieren, dennoch konnten sie nicht befruchtet werden.

7. Die Tatsache, daß ich während der letzten sechs Monate sehr häufig die Eier von Lottia durch

künstliche Parthenogenese zu entwickeln vermochte, ohne sie mit Sperma befruchten zu können, legte die Wahrscheinlichkeit nahe, daß die Methoden, welche eine künstliche Parthenogenese verursachten, imstande sein müssen, auch die Eier zu reifen, da es unwahrscheinlich erschien, daß unreife Eier sich parthenogenetisch entwickeln könnten. Diese Annahme erwies sich als richtig. Lottiaeier wurden in eine Lösung von 100 ccm Seewasser + 18 ccm $2\frac{1}{2}$ n KCl oder NaCl gesetzt und darin 40 Minuten bis 4 Stunden belassen, bei einer Temperatur von ungefähr 18° C. Nach $1^1/_2$ bis 2 Stunden herausgenommen, konnte ein kleiner Prozentsatz derselben in der Regel befruchtet werden. KCl schien etwas mehr zu wirken als NaCl. Es konnte festgestellt werden, daß bei den Versuchen mit hypertonischem Seewasser KCl im allgemeinen wirksamer für den Prozeß der künstlichen Parthenogenese war. Natriumazetat war ein weniges besser als NaCl, wahrscheinlich wegen der schwächeren alkalischen Reaktion der Lösung. Blieben die Eier zu lange in dem hypertonischen Seewasser, so litten sie und konnten nicht mehr befruchtet werden.

Diese Beobachtungen erklären die Tatsache, daß ich nicht vermochte mehr als ungefähr 5% der Eier von Lottia parthenogenetisch durch hypertonisches Seewasser zu entwickeln. Der Grund war, daß nie mehr als diese Zahl durch diese Methode zur Reife gebracht wurde. Weiter erklärt sich auch die Tat-

sache, daß die osmotische Methode der künstlichen Parthenogenese nicht immer bei Lottia erfolgreich war, da eben hypertonisches Seewasser nicht in allen Fällen Eier zu reifen vermag. Diese Beobachtungen über den Einfluß des hypertonischen Seewassers auf den Reifungsprozeß sind von besonderem Interesse, da sie den Weg für die Entscheidung über eine andere Frage zu zeigen schienen. Ich habe in meinen Schriften über künstliche Parthenogenese diese Frage öfters berührt, nämlich, ob das hypertonische Seewasser die Entwicklung der unbefruchteten Eier mehr durch physikalische oder mehr durch chemische Einflüsse bewirkt. Anfänglich war ich geneigt, anzunehmen, daß hier ein direkter physikalischer Einfluß durch Wasserentziehung aus den Kolloiden des Eies stattfindet, und besprach diese Wahrscheinlichkeit in meinen Vorlesungen noch mehr und vollständiger als in meinen Schriften, besonders in Verbindung mit dem Werk von Hardy. Daneben bestand aber auch die Möglichkeit einer chemischen Wirkung, und es sprach dafür die Tatsache, daß der Wasserverlust von seiten der Eier den Grad der elektrolytischen Dissoziation beeinflussen muß und zwar ungleichförmig für die in dem Ei enthaltenen Salze. Eine Wirkung mußte in einer Veränderung in der Konzentration der HO- oder H-Ionen in dem Ei bestehen, und dies könnte zu einer Katalyse gewisser chemischer Prozesse führen. Zeigen unsere Versuche nun an, daß der Einfluß

des Alkali auf den Reifungsprozeß chemisch ist, so ist es wahrscheinlich, daß die gleiche, wenn auch schwächere Wirkung des hypertonischen Seewassers auf den gleichen Prozeß auch chemisch ist. Ich beabsichtige die Versuche nach dieser Richtung fortzusetzen.

8. Ich versuchte, ob eine Behandlung der Eier mit einem fettlösenden Mittel, wie Benzol, nicht auch dieselben zur Reife bringen könnte. Ich fand in der Tat, daß, wenn 1 ccm Benzol 50 ccm Seewasser beigefügt und eine Emulsion durch Schütteln der Mischung hervorgebracht wurde, die Eier von Lottia, nachdem sie $^1/_4$—$^3/_4$ Minuten dieser Flüssigkeit ausgesetzt, und dann in normales Seewasser verbracht wurden, eine bis zwei Stunden später eine schwache Reifung zeigten. Blieben die Eier länger in dieser Emulsion, so unterlagen sie der Cytolyse. Besser wirkte Benzol auf Eier, die vorher zwei Stunden lang in 100 ccm Seewasser + 16 oder 18 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl sich befunden hatten, als auf solche, die in normalem Seewasser gewesen waren, d. h. es wurden durch Benzolbehandlung mehr Eier der ersteren als der letzteren Reihe zum Reifen gebracht. Wurde den durch die Benzolbehandlung gereiften Eiern Sperma beigefügt, so entwickelten sie sich meist alle. Die mit Benzol behandelten Eier reiften auch in größerer Zahl im normalen Seewasser, und besonders bei reichlicher Zufuhr von Sauerstoff viel besser als in Seewasser,

durch welches ein Wasserstoffstrom geleitet wurde. Doch war der Unterschied nicht so schlagend wie bei den mit alkalischem Seewasser behandelten Eiern. Dies kann übrigens dem Umstande zugeschrieben werden, daß die Eier, die mit Benzol behandelt werden, viel schneller reifen, als die mit alkalischem Seewasser behandelten. Deshalb wird die anfänglich in dem Seewasser vorhandene Sauerstoffmenge bei der Reifung in dem ersteren Fall länger genügen als in dem letzteren.

In Anbetracht der Wirkung von Benzol auf Fette und Lipoide untersuchte ich, ob Äther und Ester (z. B. Äthylazetat) nicht in gleicher Weise wie Benzol wirken. Die wenigen ausgeführten Versuche ergaben nur negative Resultate, doch halte ich dieselben noch nicht für erschöpfend.

9. Was die parthenogenetische Entwicklung von Lottia betrifft, so hebe ich hervor, daß die in alkalischem Seewasser oder in normalem Seewasser nach Benzolbehandlung gereiften Eier sich nie ohne Beifügung von Sperma entwickelten. Ebensowenig war es möglich, solche Eier allein nach einigen Minuten langem Verweilen in 50 ccm Seewasser + 3 ccm einer Fettsäure zur Entwicklung zu bringen. In allen Versuchen über künstliche Parthenogenese von Lottia blieb die Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser ein nicht zu entbehrender Teil des Vorganges.

10. Durch die Anwendung der oben erwähnten Methode wird es möglich, das Material von Lottia auch die letzten sechs Monate des Jahres mit derselben Leichtigkeit für Versuche zu verwenden, wie es bisher nur mit Echinodermenmaterial möglich gewesen ist. Die aus den Eiern künstlich erzielten Larven steigen an die Oberfläche des Wassers und erschienen völlig normal.

XX.

Über die Befruchtung von Seeigeleiern durch Seesternsamen[1]).

Zweite Mitteilung[2]).

I. Einleitung.

Verschiedene Probleme der Vererbungs- und Deszendenztheorie lassen es wünschenswert erscheinen, das Gebiet der Hybridisationen weiter, als es bisher geschehen ist, auszudehnen, namentlich auf solche Formen, welche nicht blutsverwandt sind. Seit einer Reihe von Jahren habe ich mich auf verschiedenen Wegen bemüht, eine allgemeine Methode zu finden, welche zu diesem Ziele führen könnte.

Nachdem ich mich überzeugt hatte, daß es möglich ist, durch bestimmte osmotische oder chemische Eingriffe die unbefruchteten Eier von Echinodermen und Anneliden zur Entwicklung zu bringen, glaubte ich, daß diese Tatsache uns vielleicht in den Stand setzen könne, nicht blutsverwandte Tiere erfolgreich

---

[1]) Pflügers Archiv für die ges. Physiologie, Bd. 99. 1903.

[2]) Die erste vorläufige Mitteilung über diese Versuche erschien in den University of California Publications, Physiology. 27. April 1903.

zu hybridisieren. Die Versuche über künstliche Parthenogenese legten den Schluß nahe, daß die entwicklungserregenden Eigenschaften eines Spermatozoons an andere Stoffe oder Bedingungen des letzteren geknüpft sind wie die Übertragung der väterlichen Eigenschaften. Es war auch weiter denkbar, daß bei nicht nahe verwandten Formen die Hybridisation deshalb nicht gelingt, weil hier die entwicklungserregenden Eigenschaften des Spermatozoons wirkungslos bleiben. Nun boten die Methoden der künstlichen Parthenogenese einen Ersatz für die entwicklungserregenden Bedingungen des Spermatozoons. Es war also denkbar, daß eine Kombination der Methoden der künstlichen Parthenogenese und der Befruchtung zum Ziele führen könnte, falls es gelingen sollte, ein Spermatozoon in das Ei einer weit entfernten Art hineinzutreiben. Ich verfuhr in der Weise, daß ich Eier mit den für die künstliche Parthenogenese geeigneten Mitteln behandelte und dann den Samen der anderen Art zusetzte. Ich bin aber auf diesem Wege noch zu keinem positiven Ergebnis in bezug auf Hybridisation gelangt[1]). Ich bin nicht einmal sicher, daß ein Ei, in dem die Entwicklung durch die spezifischen Mittel der künstlichen Parthenogenese an-

[1]) Ich habe diese Versuche kurz erwähnt auf S. 451 in meiner Arbeit Experiments on Artificial Parthenogenesis in Annelids (Chaetopterus) and the Nature of the Process of Fertilization. American Journal of Physiology vol. 4, p. 424. January 1901.

geregt ist, noch durch Samen der eigenen Art befruchtet werden kann. Ich hoffe, über diese Versuche bei einer anderen Gelegenheit berichten zu können.

Ich schlug dann einen anderen Weg ein, der darin bestand, in die Individuen, deren Kreuzung beabsichtigt war, vorher männliche oder weibliche Geschlechtsprodukte der fremden Art zu injizieren. Vielleicht war der Weg a priori verfehlt, er war jedenfalls überaus mühsam und führte in den naturgemäß nicht sehr zahlreichen Versuchen zu keinem Resultate.

Ich kam dann auf den Gedanken, daß Befruchtungen, welche im Seewasser nicht möglich seien, vielleicht in künstlich variierten Lösungen gelingen könnten. Seit einer Reihe von Jahren habe ich mich oft davon überzeugen können, daß eine kleine Änderung in der Konzentration und Konstitution der umgebenden Lösung den Geweben Eigenschaften verleiht, welche sie in der normalen Umgebung nicht besitzen oder erkennen lassen. Die parthenogenetische Entwicklung verschiedener Echinodermen und Anneliden kann beispielsweise durch für jede Form bestimmte Änderungen in der Konzentration und Konstitution des Seewassers herbeigeführt werden. Sollte es nicht möglich sein, daß bei bestimmten Änderungen in der Konstitution des Seewassers Hybridisationen gelingen sollten, welche in normalem Seewasser ausgeschlossen sind? Ich begann Versuche in dieser Richtung bereits vorigen Sommer in Woods Holl, die

ich aber nicht zu Ende führen konnte. Als ich nach Berkeley übergesiedelt war, nahm ich den Gegenstand in dem Laboratorium in Pacific Grove[1]) wieder auf, diesmal insofern mit positivem Erfolg, als es mir gelang, die Eier eines Seeigels mit dem Samen eines Seesterns zu befruchten, was bisher meines Wissens noch niemandem gelungen ist[2]).

Das Ei des Seeigels hatte ich absichtlich für diese Versuche gewählt. Es bietet einen Vorteil gegenüber den Eiern von Seesternen und vielen Anneliden insofern, als sich die Möglichkeit einer parthenogenetischen Entwicklung beim Seeigelei leicht ausschließen läßt, während das bei den anderen erwähnten Eiern nicht so leicht ist. Es ist aber nötig, wenigstens für den Anfang, mit Eiern zu arbeiten, bei denen sich in jedem Falle mit Sicherheit entscheiden läßt, ob die Entwicklung eines Eies parthenogenetisch erfolgt oder durch ein Spermatozoon hervorgerufen ist. Das ist bei dem Seeigelei möglich. Dasselbe zeigt nämlich das Eindringen eines Spermatozoons durch die Bildung einer dicken Befruchtungsmembran an, welche vorher nicht wahrnehmbar ist oder nicht existiert. Zweitens hängt die künstliche Parthenogenese beim Seeigelei von so bestimmten künstlichen Bedingungen

[1]) Meinen Kollegen von Stanford University spreche ich für die mir in ihrem Laboratorium gewährte Gastfreundschaft meinen verbindlichsten Dank aus.

[2]) Siehe v. Dungern, Neue Versuche zur Physiologie der Befruchtung. Zeitschr. f. Allgem. Physiologie Bd. 1, S. 34. 1902.

ab, daß man bei der Abwesenheit solcher Bedingungen nicht darauf rechnen kann, daß die Seeigeleier sich parthenogenetisch entwickeln[1]). Ganz anders liegen aber die Dinge für Seesterneier und viele Anneliden-eier. Bei Seesterneiern findet, wie ich neuerdings gefunden habe, gelegentlich parthenogenetische Entwicklung von einzelnen Eiern in normalem Senwasser statt, anscheinend ohne jede Erschütterung und ohne jeden äußeren Eingriff. Ohne Ursache geschieht nichts in der Natur, und diese anscheinend spontane Parthenogenese muß selbstverständlich eine Ursache haben. Diese Ursache kann aber bei den Seesterneiern in inneren Bedingungen des Eies liegen. Delage hat nämlich gezeigt, daß durch CO_2 die Entwicklung der Seesterneier in großartigem Maßstabe hervorgerufen werden kann. Da diese Eier CO_2 selbst produzieren, so ist hiermit eine Bedingung für parthenogenetische Entwicklung derselben gegeben, und da die CO_2 dem Beobachter ohne chemische Reagentien sich nicht aufdrängt, so muß demselben die durch die chemischen Bedingungen des Eies selbst hervorgerufene Entwicklung als ursachlos erscheinen. Sicher ist aber, daß solche Eier sich nicht für Hybridisationsversuche eignen. Morgan hat vor einer Reihe von Jahren mitgeteilt, daß es ihm gelungen sei, eine kleine Zahl von Seesterneiern und Seeigelsamen zur Entwicklung zu

[1]) Loeb, Fischer und Neilson, Weitere Versuche über künstliche Parthenogenese. Pflügers Archiv Bd. 87. 1901.

bringen[1]). Mathews behauptet, daß Morgan die Seesterneier durch Schütteln zur parthenogenetischen Entwicklung gebracht habe[2]). v. Dungern ist neuerdings zu dem Resultat gekommen, daß die Seesterneier eine für den Seeigelsamen giftige Substanz enthalten, welche die Befruchtung der Seesterneier durch Seeigelsamen unmöglich macht[3]). Es ist jedenfalls klar, daß Seesterneier nicht das geeignete Material für Hybridisationsversuche sind.

II. Über die Lösungen, in welchen die Seeigeleier (Strongylocentrotus purpuratus) durch den Samen der eigenen Art befruchtet werden.

1. Wir sind daran gewöhnt, es für selbstverständlich anzusehen, daß für die Befruchtung Spermatozoon und Ei ausreichen, und sind überrascht, wenn wir finden, daß bestimmte Stoffe im Seewasser für die Befruchtung der Eier gewisser Tiere unerläßlich und daß andere Stoffe hierfür bedeutungslos sind. Ich wurde erst auf diese Tatsache geführt, nachdem ich die Lösung gefunden hatte, in welchen die Hybridisation der Seeigeleier durch Seesternsamen möglich ist, und als ich dazu schreiten wollte, die Seeigeleier in denselben Lösungen durch ihren eigenen Samen zu be-

[1]) Morgan, Anatomischer Anzeiger Bd. 9, S. 141. 1893.

[2]) Mathews, The So-called Cross Fertilization of Asterias by Arbacia. Am. Journal of Physiology vol 6, p. 216. 1901.

[3]) v. Dungern, Neue Versuche zur Physiologie der Befruchtung. Zeitschr. f. allgemeine Physiologie Bd. 1, S. 34. 1902.

fruchten. Zu meiner Überraschung gelang das nicht. Das führte mich dazu, die chemischen oder physikalisch-chemischen Bedingungen zu untersuchen, unter denen die Eier eines Seeigels (Strongylocentrotus purpuratus) durch den Samen der eigenen Art befruchtet werden können.

Wenn man feststellen will, welche Stoffe für die Befruchtung der Eier eines Tieres durch den Samen der eigenen Art nötig sind, so muß man besondere Vorsichtsmaßregeln treffen, die zwar selbstverständlich sind, die aber doch besser erwähnt werden. Ehe man Samen und Eier zusammenbringt, müssen beide getrennt einige Minuten gewaschen werden, und zwar in Lösungen derselben Art, in denen die Befruchtung versucht werden soll. Ich verfuhr folgendermaßen. Je 50 ccm der Lösung, in welcher die Befruchtung versucht werden sollte, wurden in eine besondere Schale getan. In die eine Schale wurde der Same, in die andere die Eier gebracht. Um die Lösung so wenig wie möglich mit Seewasser zu verunreinigen, wurden nur zwei bis drei Tropfen Eier und ebensowenig oder noch weniger Samen benutzt. Eier sowohl wie Samen wurden ziemlich rein benutzt, d. h. mit so wenig Seewasser als möglich. Eier sowohl wie Samen blieben dann 3 bis 5 Minuten in diesen Lösungen, wobei durch gelindes Schütteln des Gefäßinhaltes die Diffusion der jedes Ei oder Spermatozoon umgebenden Flüssigkeitsschicht beschleunigt wurde.

Dann wurden beide Lösungen vermischt und so Samen und Ei zusammen gebracht. Verfährt man so, so kann man sich leicht überzeugen, daß nur in bestimmten Lösungen die Befruchtung möglich ist. Unterläßt man es aber, Eier und Samen vor der Vermischung zu waschen, so wird man widerspruchsvolle Resultate erhalten und im allgemeinen finden, daß gelegentlich in jeder Lösung die Befruchtung möglich ist. In Wirklichkeit hat aber dann die Befruchtung nicht in der betreffenden Lösung stattgefunden, sondern Samenkörperchen und Eier waren von einer Oberflächenschicht von Seewasser oder Flüssigkeit aus dem Ovarium oder Hoden umgeben, und die Dinge laufen dann für einzelne Eier und Spermatozoen so ab, als ob die in Frage stehende Lösung gar nicht vorhanden wäre.

Der zweite für diese Art von Versuchen wichtige Umstand ist die Konzentration des Samens. Man kann sich leicht davon überzeugen, daß man, um vergleichbare Resultate zu erhalten, mit einer bestimmten Konzentration des Samens arbeiten muß. Ich verfuhr so, daß ich erst die minimale Menge des Samens ermittelte, der für die sofortige Befruchtung von zwei Tropfen Eiern in 100 ccm Seewasser gerade ausreicht. Wenn man eine Suspension von Samen benutzt, die in der Pipette deutlich trüb und undurchsichtig, aber nicht weiß ist, so genügt meist der Zusatz von zwei oder drei Tropfen einer solchen Suspension,

um alle Eier in 100 ccm Seewasser innerhalb fünf Minuten (oder weniger) mit einer Befruchtungsmembran zu finden. Hat man diese minimale Konzentration des Samens für normales Seewasser ermittelt, so arbeitet man mit derselben Konzentration in allen weiteren Versuchen, in denen dieselben Eier und derselbe Samen zur Verwendung kommen[1]). Obwohl nur ein Spermatozoon für die Befruchtung eines Eies ausreicht, so kann man doch feststellen, daß bei einem sehr großen Überschuß von Samen ein gewisser, wenn auch kleiner Prozentsatz von Eiern in solchen Lösungen befruchtet werden können, in denen bei Zusatz einer für Seewasser eben ausreichenden Menge von Samen auch niemals ein einziges Ei befruchtet wird. Daß bei zunehmender Konzentration des Samens die Zahl der auf ein einzelnes Ei entfallenden Spermatozoen zunimmt, versteht sich von selbst. Es bleibt nur fraglich, ob mit der zunehmenden Konzentration des Samens nicht auch die chemische Zusammensetzung der Lösung sich ändert, sei es, daß aus den Samenfäden selbst Stoffe austreten, oder daß vielleicht Sekrete aus den Geschlechtsdrüsen mit dem Samen in die Lösung gebracht werden. Selbst bei der von mir benutzten minimalen Konzentration des Samens war die Oberfläche eines jeden Eies mit

[1]) Es ist zu berücksichtigen, daß eine Zahl von Samenfäden bald abstirbt, und daß der Zeitpunkt eintritt, wo die anfänglich genügende Konzentration des Samens nicht mehr ausreicht.

Samenfäden bedeckt. Ich habe versucht, die Entscheidung dieser Frage durch Zufügung von Extrakt von Samen herbeizuführen, bin aber noch nicht in der Lage, eine bestimmte Antwort zu geben.

2. Nach van't Hoff ist das Seewasser eine Lösung, in welcher die Bestandteile in der folgenden relativen Konzentration vorhanden sind:

100 NaCl, 7,8 $MgCl_2$, 3,8 $MgSO_4$, 2,2 KCl.

Zu dieser Lösung kommt noch Ca; in unseren Versuchen wurden 2 $CaCl_2$ der obigen Lösung zugesetzt. Da diese Lösung im folgenden oft benutzt, wird, so wollen wir sie kurz die van't Hoffsche Lösung nennen. In unseren Versuchen wurden, der ungefähren Konzentration des benutzten Seewassers entsprechend, $\frac{m}{2}$-Lösungen[1]) benutzt.

Ich fand, daß in den von mir benutzten van't Hoffschen Lösungen kein Ei von Strongylocentrotus purpuratus je befruchtet wurde.

Das war aber nicht dadurch bedingt, daß in einer solchen Lösung die Spermatozoen etwa unbeweglich sind, dieselben sind, im Gegenteil, in äußerst energischer Bewegung. Man findet auch eine Zahl von Eiern, die mit einer dichten Hülle von Spermatozoen bedeckt sind, und trotzdem tritt keine Befruchtung ein.

Fügte ich aber zu 100 ccm einer solchen Lösung 0,1 ccm einer $\frac{n}{10}$-Lösung von NaHO, so wurden alle

[1]) Das Zeichen m bedeutet grammolecular.

oder doch viele der Eier befruchtet[1]). Fügt man 0,15 oder 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung, so werden entschieden weniger Eier befruchtet, und bei Zusatz von mehr als 0,3 $\frac{n}{10}$ NaHO wird, unter der stets vorausgesetzten Bedingung einer relativ geringen, aber für Seewasser ausreichenden Samenmenge, im allgemeinen kein Ei mehr befruchtet. Ich suchte die minimale Konzentration von NaHO zu ermitteln, bei der noch Befruchtung erfolgt. Dieselbe wurde bei Zusatz von 0,09 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm der Lösung gefunden.

Bei der Beurteilung dieser Versuche bestehen nun zwei Möglichkeiten. Entweder ist die van't Hoffsche Lösung völlig neutral, oder sie enthält (infolge des Gehaltes an Magnesiumsalzen und vielleicht $CaCl_2$) hydrolytisch abgespaltene Wasserstoffionen in geringer Konzentration. Im letzteren Falle dient das NaHO, das zugesetzt war, ganz oder zum Teil zur Neutralisation der Säure, und alsdann dürfen wir aus diesen Versuchen einstweilen noch nicht den Schluß ziehen, daß freie Hydroxylionen für die Befruchtung nötig sind. Nur wenn die van't Hoffsche Lösung absolut frei von Säure wäre, würde der Schluß zu ziehen sein, daß

[1]) Als befruchtet werden solche Eier angesehen, welche eine Befruchtungsmembran bilden und sich dann furchen. Die Eier wurden gewöhnlich bis zum Blastulastadium verfolgt. In all diesen Versuchen trat bei Eiern, welche eine Befruchtungsmembran bildeten, auch die Furchung ein.

es sich hier um eine Wirkung der freien Hydroxylionen handelt. Es war mir in Pacific Grove nicht möglich, die für die Bestimmung einer so geringen Säurekonzentration, wie sie in der van't Hoffschen Lösung vorhanden sein konnte, nötigen Versuche auszuführen. Ich hoffe, das später nachzuholen. Soweit sich einstweilen beurteilen läßt, stimmen die folgenden Versuche mit der Annahme, daß die Hydroxylionen wesentlich zur Neutralisierung von Wasserstoffionen in der van't Hoffschen Lösung dienten, überein.

Auch die Eier von Strongylocentrotus Franciscanus können nur durch Samen derselben Art oder Samen von Strongylocentrotus purpuratus befruchtet werden, wenn NaHO in der hier angegebenen Konzentration zu der van't Hoffschen Lösung zugefügt wird.

3. Es war vorauszusehen, daß Lösungen solcher Salze, in welchen freie, hydrolytisch abgespaltene Hydroxylionen enthalten sind, mit Erfolg die Stelle von NaHO-Lösungen übernehmen können. Setzt man zu 100 ccm einer van't Hoffschen Lösung 0,05 ccm einer $\frac{5}{24}$ m-Lösung von Na_2CO_3 zu, so können ca. 20% der Eier befruchtet werden. Fügt man 0,1 ccm einer solchen Lösung hinzu, so werden nur wenige Eier befruchtet (beispielsweise (1%). Bei Zusatz von 0,2 ccm $\frac{5}{24}$ m Na_2CO_3 oder mehr zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung wurde kein einziges Ei mehr befruchtet. In diesem Falle handelte es sich nicht um eine schädliche Wirkung der Co_3-Ionen. Denn

wenn man statt Na_2CO_3 $NaHCO_3$ wählt, so muß man relativ große Quantitäten zusetzen, wenn eine Befruchtung erfolgen soll, und, was wichtiger ist, in solchen Lösungen werden dann in der Regel alle Eier befruchtet, wie die Daten der Tabelle I erkennen lassen.

Tabelle I.

Natur der Lösung				Prozentsatz der Eier, welche befruchtet werden
(1)	100 ccm	van't Hoffsche Lösung	+ 0,1 ccm $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	0%
(2)	100 „		+ 0,2 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	0%
(3)	100 „		+ 0,4 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	0%
(4)	100 „		+ 0,8 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	20%
(5)	100 „		+ 1,2 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	40%
(6)	100 „		+ 2,0 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	50%
(7)	100 „		+ 4,0 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	100%

Dieser Versuch war vielleicht nicht ganz typisch, da in den übrigen Versuchen schon bei Zusatz von 0,8 ccm der Bicarbonatlösung gewöhnlich fast alle Eier und bei Zusatz von 0,4 ccm oft viele Eier befruchtet werden. Diese letzteren Versuche sprechen wohl mehr zugunsten der Ansicht, daß die freien Hydroxylionen nicht direkt für die Befruchtung der Strongylocentroteneier nötig sind, sondern nur zur Neutralisation der in der van't Hoffschen Lösung vorhandenen freien Wasserstoffionen.

Wir müssen nur hier wieder einen Punkt betonen, auf welchen wir schon vorhin die Aufmerksamkeit gelenkt haben, daß nämlich in Lösungen 1, 2 und 3 der

Tabelle I, in welchen keine Befruchtung stattfand, die Bewegungsenergie der Spermatozoen eine sehr große war. Das ergab sich beispielsweise daraus, daß die Eier von den Spermatozoen hin und hergerollt wurden. Die letzteren bildeten einen dichten, charakteristischen Belag um jedes Ei, ein Beweis, daß Samen im Überfluß vorhanden war, und daß auch die in normalem Seewasser zu beobachtende Agglutination des Samens am Ei nicht fehlte. Wenn man beobachtet, wie sich die Spermatozoen mit der größten Energie an die Eier drängen, so erwartet man jeden Augenblick, ein Ei befruchtet zu finden. Noch nach 24 Stunden und später findet man in den Lösungen mit zu wenig $NaHCO_3$ den Samen in dieser lebhaften Tätigkeit, ohne daß auch nur ein einziges Ei befruchtet wird.

Auch ein Zusatz von Natriumcitrat zur van't Hoffschen Lösung erwies sich als sehr wirksam. Schon bei Zusatz von 0,05 ccm $\frac{m}{8}$ Natriumcitrat zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung wurden alle Eier befruchtet, und das Resultat war dasselbe bei Zusatz bis 1,6 ccm dieser Salze.

4. Es fragte sich ferner, ob alle die Bestandteile der van 't Hoffschen Lösung oder des Seewassers für die Befruchtung nötig seien. Die Bedeutung der Citrate und Carbonate, welche wir vorhin erwähnten, könnte vielleicht zu der Annahme verleiten, als ob die mehrwertigen Anionen für die Befruchtung besonders

wichtig seien. Das wird aber durch die Tatsache widerlegt, daß, wenn man die Sulfate aus der van't Hoffschen Lösung wegläßt, der Prozentsatz der befruchteten Eier zum mindesten nicht abnimmmt, vorausgesetzt, daß man eine genügende Menge NaHO oder freie Hydroxylionen in irgend einer Form zusetzt. Außer den Sulfaten kann auch das Mg und K aus der Lösung weggelassen werden, ohne daß die Befruchtungsfähigkeit der Eier leidet. Ganz überraschend aber ist die Bedeutung von Kalzium-Ionen oder -Salze für den Befruchtungsvorgang. Wenn man nämlich eine Lösung herstellt, welche NaHO und alle Bestandteile der van't Hoffschen Lösung mit Ausnahme des Kalziumchlorids enthält, so wird auch nicht ein einziges Ei befruchtet. Das Magnesium ist außerstande, in diesem Falle das Kalzium zu ersetzen. Die Bedeutung des Kalziums für die Befruchtung ist ebenso schlagend wie die des NaHO oder des $NaHCO_3$. Die Versuchsreihe, welche in Tabelle II wiedergegeben ist, mag es veranschaulichen.

So lange also die Lösung weniger als 1 ccm $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$ enthält, wird kein Ei befruchtet, erst bei Zusatz von 2 ccm $CaCl_2$ tritt allgemeine Befruchtung ein. In anderen Versuchsreihen erwies sich der Zusatz von 1,5 ccm $CaCl_2$ zu 100 ccm NaCl als ausreichend, um Befruchtung in der Majorität der Eier herbeizuführen. Bis jetzt ist es mir auch nicht geglückt, einen Ersatz für NaCl in diesen Versuchen zu finden. Wenn in der

Tabelle II.

	Natur der Lösung	Prozentsatz der Eier, welche befruchtet werden
(1)	100 ccm Seewasser	100%
(2)	100 NaCl 7,8 $MgCl_2$ 3,8 $MgSO_4$ 2,2 KCl 0,8 $NaHCO_3$ [1])	0%
(3)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 0,1 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	0%
(4)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 0,2 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	0%
(5)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 0,4 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	0%
(6)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 0,8 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	0%
(7)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 1,2 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	2%
(8)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 1,6 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	10%
(9)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 2,0 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	80%
(10)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 3,0 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	80%
(11)	100 „ 7,8 „ 3,8 „ 2,2 „ 0,8 „ + 4,0 $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$	100%

[1]) Alle Lösungen wurden in $\frac{1}{2}$ mol. Konzentration benutzt.

van't Hoffschen Lösung das NaCl durch die gleiche Konzentration von LiCl oder Rohrzucker ersetzt wurde, so trat trotz dem Zusatz von NaHO oder $NaHCO_3$ in keinem einzigen Ei Befruchtung ein.

Diese Versuche bilden vielleicht eine Ergänzung zu der Lösung eines alten Problems in der Physiologie der Befruchtung, nämlich ob neben den Spermatozoen auch noch die aus den accessorischen Drüsen der Geschlechtsapparate stammenden Sekrete, z. B. das Prostatasekret, für die Befruchtung eine Rolle spielen. Der Nachweis, daß die Eier vieler Seetiere im Seewasser befruchtet werden, wo anscheinend nur die Wirksamkeit der Spermatozoen zur Geltung kommen kann, führte zu der Ansicht, daß nur die Spermatozoen für die Befruchtung nötig sind. Demgegenüber war es eine Überraschung, als Steinach[1]) den Nachweis führte, daß nach Exstirpation der accessorischen Geschlechtsdrüsen die Eier von Ratten nicht mehr so leicht befruchtet werden, obwohl Begattung stattfindet. Es scheint nunmehr, daß auch für gewisse Seetiere, deren Eier im Seewasser befruchtet werden, gewisse Substanzen außer Ei und Samen für die Befruchtung nötig sind, nur finden sich dieselben wesentlich im Seewasser. Daß außerdem im Sekret der Hoden der Seesterne und Seeigel ebenfalls solche Substanzen vorhanden sind, die

[1]) Steinach, Dieses Archiv Bd. 56, S. 304. 1894.

günstig auf eine Befruchtung wirken, ist eine Möglichkeit, die sich mir wiederholt bei diesen Versuchen aufgedrängt hat. Beobachtungen über die Befruchtung von Froscheiern haben Roux auf einen ähnlichen Gedanken geführt[1]).

III. Ist die Befruchtung von Seeigeleiern durch Seesternsamen in normalem Seewasser möglich?

Im vorigen Sommer versuchte ich in Woods Holl, Seeigeleier (Arbacia) durch Seesternsamen (Asterias Forbesii) zu befruchten. Obwohl ich Samen im Überschuß zusetzte, gelang es mir nicht, auch nur ein befruchtetes Ei zu finden. Ich setzte dann dem Seewasser $NaHCO_3$ zu, in der Hoffnung, daß das vielleicht die Hybridisation ermögliche. Aber auch so erfolgte keine Befruchtung. Das Seewasser, das ich benutzte, war das im Laboratorium in Woods Holl zirkulierende Seewasser, in dem die Eier von Arbacia mit dem Samen derselben Art sehr leicht, d. h. schon bei geringer Konzentration des Samens, sofort alle befruchtet werden[2]).

---

[1]) Roux, Über die Ursachen der Bestimmung der Hauptrichtungen des Embryo im Froschei. Anatomischer Anzeiger Bd. 23, S. 65. 1903. — Auch Winklers bekannte Versuche sprechen in gleichem Sinne.

[2]) Andere Beobachter, welche, wie v. Dungern, ähnliche Versuche in Neapel anstellten, sind ebenfalls zu völlig negativen Resultaten gelangt. Siehe v. Dungern loc. cit.

Dieses Frühjahr versuchte ich in Pacific Grove Eier von Strongylocentrotus purpuratus und Strongylocentrotus Franciscanus durch Seesternsamen (Asterias ochracea) in normalem Seewasser zu befruchten. Ich benutzte ebenfalls das Wasser, daß im Laboratorium zirkulierte, und in welchem die Eier der beiden Seeigelarten mit der größten Leichtigkeit durch Samen derselben Art befruchtet werden, und in dem sie sich gut halten und entwickeln. Obwohl ich Hunderte von Versuchen anstellte und mit den verschiedensten Graden der Konzentration des Samens arbeitete, gelang es mir doch nicht, auch nur ein einziges Seeigelei durch Seesternsamen zu befruchten.

Als es mir dann gelang, künstliche Lösungen zu finden, in denen die Seeigeleier durch Seesternsamen befruchtet werden können, und es sich herausstellte, daß schon geringe Konzentrationsänderungen gewisser Substanzen in der umgebenden Lösung die Befruchtung unmöglich machen, verfiel ich auf den Gedanken, daß das Seewasser der Aquarien vielleicht Substanzen enthalte, welche die Befruchtung des Seeigeleies durch Seeigelsamen zwar gestatten, die durch Seesternsamen aber verhindern. Ich dachte besonders an Metallsalze, welche in geringer Konzentration aus den Wasserleitungsröhren in das Seewasser des Laboratoriums gelangen, und welche teils direkt oder durch hydrolytisch abgespaltene Säure die Hybridisation vereiteln. Um das zu prüfen, stellte ich eine große Zahl

von Versuchen mit Seewasser an, das direkt in Glasgefäßen an der Küste (in der Brandung) geschöpft wurde. Ein Übelstand war dabei, daß in der Nähe Kolonien von Seeigeln sich befanden, und daß es nötig war, das Seewasser erst auf 60° zu erhitzen, um es sicher von lebendem Samen zu befreien[1]). In solchem Seewasser gelang es, bei sehr hoher Konzentration des Samens gelegentlich einige Eier von Strongylocentrotus purpuratus mit dem Samen von Asterias ochracea zu befruchten. Der Zusatz von Samen im Überschuß war eine absolute Bedingung, so daß mir der Verdacht kam, daß vielleicht gewisse Stoffe aus den (absterbenden oder toten) Spermatozoen in das Seewasser erst austreten müssen, ehe die Befruchtung möglich wird. Um das zu entscheiden, erhitzte ich Seesternsamen auf 50° (um die Spermatozoen zu töten) und fügte dann das Filtrat solchen Samens oder den Samen selbst zu den Seeigeleiern. Ich erwartete, daß in dem Falle eine geringe Menge von Seesternsamen zur Hybridisierung ausreichen würde. Die Versuche ergaben kein bestimmtes Resultat.

Die Zahl der im Seewasser mit Seesternsamen befruchteten Eier von Strongylocentrotus war stets sehr klein. Man konnte nach langem Suchen ein befruchtetes Ei vielleicht unter etwa 10000 Eiern entdecken.

[1]) Dabei wurde Kohlensäure ausgetrieben.

Selbst in den besten Fällen erreichte die Zahl der befruchteten Eier nicht ein Prozent. Es war sehr merkwürdig, daß die Eier, die überhaupt befruchtet wurden, meist, wenn auch nicht immer, sehr spät, d. h. erst einige Stunden nach dem Samenzusatz, die Befruchtungsmembran zeigten und entsprechend später sich furchten. Auch das könnte den Gedanken nahe legen, daß erst das Seewasser resp. das Ei eine Änderung erleiden, ehe die Samenfäden des Seesterns eintreten können.

Ich glaubte schon, daß damit die Sache erledigt sei, und daß das Seewasser aus den Leitungen des Laboratoriums sich anders verhalte als das Seewasser aus dem offenen Ozean. Als ich aber dann zwei Wochen später in Bolinas, einem weiter nördlich gelegenen Punkte der kalifornischen Küste, diese Versuche wiederholte, stellte es sich heraus, daß auch hier in dem aus dem Ozean geschöpften Seewasser die Befruchtung der Eier von Strongylocentrotus purpuratus mit Samen von Asterias ochracea nicht gelang. Es handelte sich also hier um den Einfluß einer bisher noch nicht bestimmten Variabel, die physikalischer oder chemischer Natur sein kann. Es war mir nicht mehr möglich, die Versuche zur Bestimmung dieser Variabeln dieses Jahr durchzuführen. Wir werden im nächsten Abschnitt sehen, daß eine kleine Erhöhung der Menge des NaHO, welche der van't Hoffschen Lösung zugesetzt wird, die Hybridi-

sation der Seeigeleier mit Seesternsamen ermöglicht. Da es sich hier um die Wirkung von „Spuren" handelt, so ist es durchaus möglich, daß innerhalb der Variationen des Seewassers, welche noch in die Breite des Begriffes „normales Seewasser" fallen, die Hybridisation der Seeigeleier durch Seesternsamen bald — in geringem Maße wenigstens — möglich und bald ausgeschlossen ist. Solche Variationen sind denkbar in bezug auf den Kohlensäuregehalt des Seewassers, oder in bezug auf Stoffe, welche aus Pflanzen und Tieren austreten (namentlich, wo starke Brandung herrscht), oder in bezug auf Temperatur usw.

Es ist aber zu berücksichtigen, daß selbst im besten Falle in meinen bisherigen Versuchen nur ein winziger Prozentsatz der Eier in Seewasser hybridisiert werden konnte, während in den künstlichen Lösungen 50—80% derselben Eier befruchtet wurden.

Das bisher Gesagte bezieht sich auf die Eier von Strongylocentrotus purpuratus. Mit den Eiern von Strongylocentrotus franciscanus habe ich wenige Versuche angestellt, die aber bisher ausnahmslos ergeben haben, daß die Eier von Strongylocentrus franciscanus in normalem Seewasser absolut immun sind gegen den Samen von Asterias ochracea, selbst wenn das Seewasser direkt aus dem Ozean in Pacific Grove entnommen wurde.

IV. Über die Lösungen, in welchen die Eier von Strongylocentrotus purpuratus mit dem Samen von Asterias ochracea befruchtet werden können.

1. Wegen der Neuheit der Methode mag es vielleicht am besten sein, mit der Schilderung der ersten Versuche über diesen Gegenstand zu beginnen.

I. Versuch.

Die Eierstöcke eines Weibchens wurden mit den Vorsichtsmaßregeln, die ich bei Gelegenheit meiner Versuche über künstliche Parthenogenese beschrieben habe, in steriles Seewasser gebracht. Zwei Tropfen dieser Eier wurden in die folgenden Lösungen gebracht.

(1) 100 ccm normales Seewasser

(2)	100 „	van't Hoffsche Lösung	(1,5 ccm $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,1 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO
(3)	100 „		(1,5 „ $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,15 „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(4)	100 „		(1,5 „ $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,2 „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(5)	100 „		(1,5 „ $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,25 „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(6)	100 „		(1,5 „ $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,3 „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(7)	100 „		(1,5 „ $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,4 „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(8)	100 „		(1,5 „ $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,5 „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(9)	100 „		(3,5 „ $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,25 „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(10)	100 „		(4,5 „ $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) + 0,25 „ $\frac{n}{10}$ NaHO

Dann wurde je ein Tropfen konzentrierten Asteriassamens (der wurstförmig aus den Hoden des geschlechtsreifen Tieres

ausströmt) zugesetzt, und dann wurde das Ganze vorsichtig umgerührt, bis der Same eine homogene Suspension bildete, welche der Lösung ein trübes (nicht weißes) Aussehen verlieh. Bei diesem Vorgang kommen alle Eier mit dem Samen in Berührung.

Die Besamung erfolgte um 10^h 30′. Um 10^h 45′, 11^h 25′ und 1^h 30′ wurde je eine Portion der Eier vorsichtig aus den Lösungen in ein Gefäß mit normalem Seewasser gebracht. Ein Teil der Eier blieb in den ursprünglichen Lösungen.

Während der ersten halben Stunde nach dem Zusatz des Samens wurden den verschiedenen Lösungen Proben der Eier entnommen und auf das Vorhandensein von Befruchtungsmembranen untersucht. Es ergab sich, daß in den Lösungen 6, 7, 9 und 10 viele Eier eine Befruchtungsmembran gebildet hatten, während die Eier in Lösung 1, 2 und 3 absolut frei von Befruchtungsmembranen waren und in 4, 5 und 8 sich gelegentlich ein Ei mit Befruchtungsmembran fand. Die größte Zahl von Eiern mit Befruchtungsmembran, nämlich nahezu die Hälfte, fand sich in Lösung 6.

Drei Stunden nach der Befruchtung wurden in all den Lösungen, in welchen vorher Eier mit Membranen gefunden worden waren, gefurchte Eier gefunden (Zweizellstadien). Es waren nur solche Eier gefurcht, welche eine Befruchtungsmembran besaßen. Um 6 Uhr waren diese Eier bis zum 16-Zellstadium oder etwas weiter vorgeschritten. Die Furchung war normal. Aber nicht alle Eier mit Befruchtungsmembran begannen ihre Furchung gleichzeitig, vermutlich, weil sie nicht alle gleichzeitig, d. h. sofort, befruchtet waren.

Am nächsten Morgen fanden sich in den Lösungen, in denen die Eier eine Befruchtungsmembran gebildet und sich gefurcht hatten, schwimmende Blastulae. Die Zahl derselben war am zahlreichsten in den in Lösung 6 und 7 gebliebenen und den um 11^h 25′ aus diesen Lösungen in Seewasser zurückgebrachten Eiern. Aber nur etwa 10% der Eier hatten das Blastulastadium erreicht. Die übrigen 40%, welche eine Befruchtungsmembran gebildet hatten, hatten sich entweder nicht gefurcht oder waren auf früheren Furchungsstadien stehen geblieben und anscheinend abgestorben.

Lösung 1 (normales Seewasser) wurde mit der größten Sorgfalt durchsucht, aber kein einziges Ei mit Membran, kein gefurchtes Ei und keine Blastula wurde gefunden. Genau dasselbe war der Fall für Lösung 2. In Lösung 3 fanden sich bei genauem Suchen vereinzelte Blastulae, vielleicht eine Blastula unter 1000 Eiern. Lösung 4 ergab ungefähr dasselbe Resultat. In Lösung 5 hatten sich ungefähr 5% der Eier gefurcht und ungefähr 1% hatte das Blastulastadium erreicht. In Lösung 9 und 10 hatten sehr viele Eier (über 50%) eine Befruchtungsmembran gebildet, aber nur wenige sich entwickelt.

Am folgenden Tage fanden sich eine Zahl von Gastrulae, die zum Teil normal aussahen, unter den Eiern, die aus Lösung 7 und 6 in normales Seewasser zurückgebracht worden waren. Es war auffallend, daß die Mehrzahl der Blastulen gestorben war. Eine kleine Zahl von Blastulen fuhr fort, sich zu entwickeln, und vom fünften Tage an fanden sich einige Gastrulen mit Kalknadeln (Dreistrahlern), die in einigen Fällen zu einem rudimentären Skelett auswuchsen. Aber das letztere blieb selbst in den besten Fällen rudimentär.

Bei diesem Versuch war eine Reihe von Fehlerquellen zu berücksichtigen. Erstens war es denkbar, daß die Eier von Strongylocentrotus mit Samen ihrer eigenen Art infiziert waren. Diese Möglichkeit war dadurch ausgeschlossen, daß kein einziges dieser Eier in normalem Seewasser eine Befruchtungsmembran bildete oder sich entwickelte. Zweitens hätte es sich um künstliche Parthenogenese handeln können. Einmal hätte die parthenogenetische Entwicklung durch die mechanische Behandlung der Seeigeleier bei der Befruchtung die parthenogenetische Entwicklung veranlassen können. Dagegen sprach alle meine frühere Erfahrung, und es war in diesem Falle dadurch unwahrscheinlich gemacht, daß die Eier, welche sich in

normalem Seewasser (Lösung 1) befanden, alle genau dieselbe mechanische Behandlung erfahren hatten, ohne sich zu entwickeln. Zweitens war die Möglichkeit vorhanden, daß die künstlichen Lösungen eine parthenogenetische Entwicklung der Eier veranlaßten. Das war zwar nicht wahrscheinlich, weil bei parthenogenetischer Entwicklung der Seeigeleier, wie ich früher gezeigt habe, keine Befruchtungsmembran gebildet wird. Eine sichere Entscheidung konnte indessen leicht herbeigeführt werden. Wenn es sich um eine durch die Lösung bedingte parthenogenetische Entwicklung handelte, so müßten die Eier in diesen Lösungen sich auch ohne Zusatz von Seesternsamen entwickeln.

II. Versuch.

Es wurden zwei Versuchsreihen mit identischen Lösungen ausgeführt. In der einen Reihe wurden die Eier von Strongylocentrotus purpuratus ohne Samenzusatz in die Lösungen gebracht, in der anderen wurde Samen von Asterias zugesetzt. Die benutzten Lösungen waren:

(1)	100 ccm	van't Hoffsche Lösung	$+ 0{,}2$ ccm $\frac{n}{10}$ NaHO
(2)	100 „		$+ 0{,}3$ „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(3)	100 „		$+ 0{,}4$ „ $\frac{n}{10}$ NaHO
(4)	100 „		$+ 2$ ccm $\frac{5\,m}{8}$ m $CaCl_2 + 0{,}3\,\frac{n}{10}$ NaHO.

Das Resultat war außerordentlich schlagend. In den Lösungen 2 bis 4, in denen Seesternsamen zugefügt war, bildete mindestens die Hälfte aller Eier Befruchtungsmembrane, in Lösung 4 waren beinahe alle Eier befruchtet. Selbst in Lösung 1 wurden viele Eier befruchtet. Zwei Stunden nach

stattgehabter Befruchtung befanden sich viele dieser Eier im Zweizellstadium. Nur solche Eier gingen in das Zweizellstadium, welche eine Membran gebildet hatten. Die Furchung schritt stetig weiter, und am nächsten Morgen (ca. 20 Stunden nach stattgehabter Befruchtung) wurde eine Reihe von schwimmenden Larven gefunden. In einigen dieser Lösungen fanden sich etwa 10% der Eier im Blastulastadium. Zwei Tage darauf war alles abgestorben.

Die Eier dagegen, welche ohne Samenzusatz in die Lösungen 1 bis 4 gebracht wurden, bildeten weder eine Befruchtungsmembran noch trat in denselben eine Furchung ein. Wie in allen meinen Versuchen wurde mehr Zeit auf die Beobachtung dieses Kontrollmaterials verwendet als auf die Beobachtung des eigentlichen Versuchsmaterials.

Es war damit bewiesen, daß der Zusatz von Seesternsamen die Seeigeleier zur Entwicklung veranlaßte, und daß es sich nicht um eine durch die Natur der Lösung bedingte parthenogenetische Entwicklung handelte. Da die Eier, welche keinen Samen erhielten, mechanisch in allen Stücken ebenso behandelt wurden wie die besamten Eier, so ist auch ferner bewiesen, daß es sich hier nicht etwa um eine durch mechanische, thermische oder sonstige Mittel hervorgerufene künstliche Parthenogenese handelte. In der Folge habe ich gerade dem Verhalten von Eiern von Strongylocentrotus in den hier erwähnten Lösungen, wenn kein Samen zugefügt war, meine besondere Aufmerksamkeit zugewendet, und ich kann mit Bestimmtheit behaupten, daß die Membranbildung der Eier sowohl, wie die darauffolgende Zellteilung und Entwicklung nicht durch die Lösungen bedingt sind, sondern

lediglich durch den Zusatz von Samen. In einigen Versuchen beobachtete ich die unbefruchteten Eier in diesen Lösungen vier und sechs Tage lang. Dieselben blieben bis zuletzt rund, keine Membran bildete sich, und kein Ei furchte sich. Fügte man aber den Samen von Asterias ochracea in der richtigen Konzentration zu, so bildeten in denselben Lösungen die Eier eine Membran, und viele dieser Eier entwickelten sich. Es blieb aber noch die Möglichkeit übrig, daß nicht die lebenden Spermatozoen von Asterias die Seeigeleier zur Entwicklung brachten, sondern irgend ein mit dem Samen aus dem Hoden abgeschiedener Stoff oder ein Stoff, der aus den Samenkörperchen auswandert[1]). Ich stellte deshalb Versuche mit Samen von Asterias an, der auf 45°, 50° und 60° längere Zeit erhitzt war. Wenn Filtrate dieses Samens oder der unfiltrierte Samen zu Seewasser oder den künstlichen Lösungen gefügt wurde, welches die Eier von Strongylocentrotus enthielt, so bildete kein Ei eine Membran, und keins entwickelte sich. Es sind also die lebenden Spermatozoen zur Befruchtung nötig.

Die Zahl der Versuche, welche ich angestellt habe, um mich zu vergewissern, daß die oben erwähnten Lösungen die Befruchtung der Eier von Strongylo-

[1]) Winklers Versuche könnten darauf hinweisen, allein in Winklers Versuchen teilten sich die Eier ohne Bildung einer Befruchtungsmembran.

centrotus mit dem lebenden Samen von Asterias gestatten, und daß die Entwicklung der Eier ohne Samenzusatz bei sonst gleicher chemischer, mechanischer oder thermischer Behandlung nicht erfolgt, ist sehr groß und beläuft sich auf mehrere Hunderte. Es versteht sich von selbst, daß jeder Versuch von einem Kontrollversuch begleitet wurde, in welchem unbefruchtete Eier von Strongylocentrotus ohne jeden Zusatz in Seewasser blieben, um festzustellen, ob eine Befruchtung mit Samen der eigenen Art stattgefunden hatte. Diese Kontrolleier wurden im übrigen ebenso behandelt wie die mit Asteriassamen befruchteten, d. h. wenn die letzteren aus der Lösung mit Seewasser übertragen wurden, so wurden gleichzeitig auch eine Portion der Kontrolleier in ein Gefäß mit demselben Seewasser übertragen. Nie bildete eins dieser Kontrolleier eine Membran oder furchte sich.

2. Es ist aus den mitgeteilten Versuchen ersichtlich, daß die Konzentration der Natronlauge hier eine entscheidende Rolle spielt. Eine lange Reihe von Versuchen diente dem Zweck, das bestimmter festzustellen. Es ergab sich als ganz allgemeines Resultat, daß in einer van't Hoffschen Lösung, der kein NaHO zugefügt war, niemals auch nur ein einziges Ei von Strongylocentrotus durch Asteriassamen befruchtet wurde, d. h. in keinem Falle bildete ein Ei unter diesen Umständen eine Membran oder trat eine Furchung ein.

Das galt auch fast ebenso allgemein für den Fall, wenn zu 100 ccm van't Hoffschen Lösung bis zu 0,1 ccm einer $\frac{n}{10}$ NaHO-Lösung zugesetzt werde. Wurde aber mehr NaHO zugesetzt, etwa 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung, so wurde häufig ein kleiner Teil der Eier befruchtet. Das Maximum der Wirkung trat aber meist erst ein, wenn 0,3 oder 0,4 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung zugesetzt wurde. Wurde mehr, z. B 0,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung, zugesetzt, so wurden keine oder nur relative wenige Seeigeleier von Seesternsamen befruchtet. Bei Zusatz von 0,6 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO habe ich niemals eine Befruchtung beobachtet.

Es lag nahe, zu versuchen, ob Salze, deren Lösungen hydrolytisch abgespaltene Hydroxylionen enthalten, ebenso wirken wie Zusatz der Alkalien selbst. Na_2CO_3 gab, wie erwartet, sehr bestimmte positive Resultate. Zusatz von 0,05 ccm oder, noch besser, 0,075 ccm einer $\frac{5}{8}$ m Na_2CO_3-Lösung zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung ermöglichte in der Regel die Hybridisation der Seeigeleier mit Seesternsamen. Als Beispiel möge der in Tabelle III wiedergegebene Versuch dienen.

Tabelle III.

Natur der Lösung	Prozentzahl der mit Seesternsamen befruchteten Seeigeleier
100 ccm van't Hoffsche Lösung	0%
100 „ „ „ „ + 0,1 ccm $\frac{m}{8}$ Na_2CO_3	1%
100 „ „ „ „ + 0,2 „ $\frac{m}{8}$ Na_2CO_3	3%
100 „ „ „ „ + 0,3 „ $\frac{m}{8}$ Na_2CO_3	40%
100 „ „ „ „ + 0,4 „ $\frac{m}{8}$ Na_2CO_3	5%
100 „ „ „ „ + 0,5 „ $\frac{m}{8}$ Na_2CO_3	0%
100 „ „ „ „ + 0,6 „ $\frac{m}{8}$ Na_2CO_3	0%

Für die Entscheidung der Frage, ob die in diesen Versuchen der van't Hoffschen Lösung zugesetzten Hydroxylionen nur dazu dienten, etwaige in dieser Lösung enthaltene Wasserstoffionen zu neutralisieren, oder ob sie direkt die Eier und Samenkörperchen beeinflußten, können Versuche mit $NaHCO_3$ dienen. Selbst wenn ich 1,5 ccm $\frac{m}{8}$ $NaHCO_3$ zur van't Hoffschen Lösung zugefügte, trat keine Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen ein. Das spricht allerdings mehr für die Annahme, daß es sich hier nicht um eine bloße Neutralisation der etwa in der van't Hoffschen Lösung enthaltenen Wasserstoffionen durch das zugefügte NaHO handelte, sondern um eine direkte Mitwirkung der freien Hydroxylionen.

Es war mir unerwartet, daß Zusatz einer Natriumcitratlösung (0,2 bis 1,6 ccm einer $\frac{5}{8}$ m Lösung) zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung die Befruchtung der Seeigeleier mit Seesternsamen nicht ermöglichte. Zusatz von Na_2HPO_4 zu den van't Hoffschen Lösungen war ebenfalls wirkungslos, was ja nach dem Verhalten von $NaHCO_3$ zu erwarten war.

Ich stellte eine gewisse Zahl von Versuchen an, in denen zunächst die optimale Quantität von $\frac{n}{10}$ NaHO ermittelt wurde, welche zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung zugesetzt werden muß, wenn die Seeigeleier mit Seesternsamen befruchtet werden sollen. Wenn man einer solchen Lösung dann eine kleine Quantität von $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$ zusetzte (z. B. 0,2 bis 0,8 ccm zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung), so wurden weniger Eier befruchtet, und oft wu rdedie Befruchtung, bei geeigneter Wahl der Konzentration, in dieser Weise ganz unmöglich gemacht. Ebenso wirkte Zusatz einer kleinen Quantität von Na_2HPO_4 zu einer alkalischen van't Hoffschen Lösung. Die Erklärung für diese Erscheinung liegt wohl darin, daß die Lösung von $NaHCO_3$ und Na_2HPO_4 wie eine schwache Säure wirkt und so die Konzentration der freien Hydroxylionen in der alkalisch gemachten van't Hoffschen Lösung verringert. Die Lösung verhält sich dann so, als ob man ihr von vornherein weniger oder zu wenig NaHO zugesetzt hätte.

3. Es wurde weiter untersucht, ob alle die anderen Bestandteile der van't Hoffschen Lösung für die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen nötig oder gleich wichtig seien. Es stellte sich heraus, daß die SO_4-, K- und Mg-Salze einzeln oder alle weggelassen werden können, ohne daß die Hybridisationsfähigkeit der Eier eine merkliche Einbuße erleidet.

Lösungen von der folgenden Art 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 2 ccm $\frac{m}{2}$ $CaCl_2$ + 0,2 bis 0,4 ccm $\frac{m}{2}$ NaHO, erwiesen sich als ebenso wirksam wie die korrespondierenden Lösungen, welche außerdem noch Mg-, K- und SO_4-Salze in den Konzentrationen enthielten, in welchen dieselben im Seewasser resp. in der van't Hoffschen Lösung vorhanden sind. Läßt man aber in der van't Hoffschen Lösung die Kalziumsalze fort, so findet keine Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen statt, wie viel NaHO man auch zusetzen mag. Auch wenn man für den Ausfall des $CaCl_2$ die entsprechende Menge $MgCl_2$ oder $MgSO_4$ zusetzt, so bleibt die Hybridisation dennoch wirkungslos. Die folgende Tabele IV gibt eine Idee von der Konzentration der Ca-Salze, welche für die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen nötig ist.

Beim Ersatz des NaCl in der van't Hoffschen Lösung durch eine isosmotische Zuckerlösung oder Lösung von LiCl trat ebenfalls keine Befruchtung ein.

Tabelle IV.

Natur der Lösung	Prozentsatz der Seeigeleier, welche durch Seesternsamen befruchtet wurden
(1) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO	0%
(2) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 0,2 ccm $\frac{n}{8}$ $CaCl_2$	0%
(3) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 0,4 ccm $\frac{n}{8}$ $CaCl_2$	0%
(4) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 0,6 ccm $\frac{n}{8}$ $CaCl_2$	0%
(5) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 0,8 ccm $\frac{n}{8}$ $CaCl_2$	einzelne Eier befruchtet
(6) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 1,0 ccm $\frac{n}{8}$ $CaCl_2$	1%
(7) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 1,5 ccm $\frac{m}{8}$ $CaCl_2$	10%
(8) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 2,0 ccm $\frac{m}{8}$ $CaCl_2$	10%
(9) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 3,0 ccm $\frac{m}{8}$ $CaCl_2$	30%
(10) 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO + 4,0 ccm $\frac{m}{8}$ $CaCl_2$	5%

Die Mg-, K- und SO-Salze sind dagegen von Wichtigkeit für die Entwicklung der befruchteten Eier. Beim Fehlen eines oder aller dieser Salze leidet die

Entwicklung der befruchteten Eier, was ja nach den schönen Versuchen von Herbst zu erwarten war.

Zu den für die Befruchtung nötigen Stoffen gehört auch aller Wahrscheinlichkeit nach der Sauerstoff. Besondere Versuche habe ich hierüber noch nicht angestellt, allein mehrere Beobachtungen sprechen hierfür. Erstens wurden oft mehr Eier derselben Lösung und mit derselben Konzentration des Samens befruchtet, wenn sie in flachen Uhrschälchen lagen, wo nur eine dünne Wasserschicht sie von der Luft trennte, als in tiefen Gefäßen mit hoher Flüssigkeitssäule. Zweitens wurden allgemein mehr Eier befruchtet, wenn sie in dünner Schicht ausgebreitet lagen und einander nicht den Sauerstoff streitig machen konnten, als wenn sie in dicker Schicht einander bedeckten. Drittens wurden die Eier, die mit einer zu dicken Schicht von Samenkörperchen bedeckt waren, nicht so leicht befruchtet, als wo die Schicht nicht so dick war.

V. Versuche über die Befruchtung von Seesterneiern (Asterias ochracea) mit Samen ihrer eigenen Art.

Nachdem die Versuche über Befruchtung und Hybridisation der Seeigeleier abgeschlossen waren, wurden Versuche über die Bedingungen der Befruchtung der Seesterneier (Asterias ochracea) durch den Samen ihrer eigenen Art angestellt. Das Material zu diesen Versuchen war nicht aus dem Ozean, sondern

aus der Bucht von Franzisko entnommen, wo der Salzgehalt geringer ist als im Ozean. Ich wollte versuchen, ob für die Befruchtung der Seesterneier durch Samen der eigenen Art dieselben chemischen Bedingungen gelten wie für die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen. Wenn das der Fall wäre, so wäre bewiesen, daß der Einfluß, den die umgebende Lösung auf die Befruchtung des Seeigeleies durch Seesternsamen ausübt, ganz oder wesentlich durch eine Beeinflussung der Eigenschaften der Seesternspermatozoen bedingt ist.

Es zeigte sich nun, daß es nicht leicht war, die Eier von Asterias ochracea mit dem Samen ihrer eigenen Art zu befruchten. Das mag daran gelegen haben, daß die Laichzeit vielleicht zum Teil vorüber war, und daß die Eier nicht im besten Zustand waren[1]). Es gelang im allgemeinen viel besser, die Eier parthenogenetisch zur Entwicklung zu bringen als durch Befruchtung, eine Erfahrung, die auch Delage gemacht hat. Ich beobachete bei diesen Versuchen auch, daß, wie schon erwähnt, Seesterneier sich gelegentlich in normalem Seewasser parthenogenetisch entwickeln, ohne das mechanische Agitation oder Temperaturerniedrigung für diese Entwicklung verantwortlich gemacht werden kann. Wo aber eine Befruchtung der Asteriaseier durch den Samen der

[1]) Nur ein kleiner Prozentsatz der Eier reifte im Seewasser.

eigenen Art gelang, waren stets mehr Eier befruchtet in normalem Seewasser als in den künstlichen Lösungen, welche sich für die Befruchtung der Seeigeleier mit Asteriassamen so günstig erwiesen. Es mag sein, daß mit Seesternen aus dem Ozean und bei Eiern, die in einem besseren Zustand der Reife sich befinden, die Resultate anders ausfallen, aber meine bis jetzt erlangten Ergebnisse deuten darauf hin, daß der fördernde Einfluß der umgebenden Lösung auf die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen sich nicht auschließlich auf den Samen erstreckt, sondern vielmehr auch oder hauptsächlich auf das Seeigelei.

VI. Über die relative Immunität der Seeigeleier gegen Seesternsamen und gegen Samen der eigenen Art.

1. Es ist bereits aus dem bisher Gesagten ersichtlich geworden, daß die Lösungen, in denen die Seeigeleier (Strongylocentrotus purpuratus) am besten durch den Samen der eigenen Art befruchtet werden, nicht identisch sind mit den Lösungen, in denen sie am besten durch den Samen des hier benutzten Seesterns, Asterias ochracea, befruchtet werden. Da aber diese Versuche möglicherweise für die Forschungen auf dem Gebiete der Immunitätserscheinungen von Nutzen sein können, so hielt ich es für erwünscht, diese Tatsachen etwas genauer zu prüfen. Wir haben gesehen, daß

die Eier von Strongylocentrotus purpuratus durch Samen der eigenen Art wie durch Samen von Asterias in der van't Hoffschen Lösung nur dann befruchtet werden können, wenn derselben ein kleiner, aber bestimmter Betrag von NaHO zugefügt worden ist. Die Immunitätsverhältnisse des Eies gegen Samen der eigenen Art oder gegen fremden Samen beruhen nun darauf, daß die optimale Konzentration des NaHO für beide Arten von Samen verschieden ist. Während man zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung 0,1 bis 0,2 ccm einer $\frac{n}{10}$ NaHO-Lösung zufügen muß, um Befruchtung des Seeigeleies durch Samen der eigenen Art herbeizuführen, ist für die Befruchtung derselben Eier durch Seesternsamen 0,3 bis 0,4 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO erforderlich. Das Erstaunliche aber ist, daß in der letzten Lösung die Befruchtung der Seeigeleier durch Samen der eigenen Art erschwert resp. unmöglich ist. Es ergab sich auf diese Weise das ganz unerwartete Resultat, daß, während die Seeigeleier in normalem Seewasser und einer Reihe von Lösungen gegen Seesternsamen immun sind, sie in gewissen Lösungen, in welchen sie durch Seesternsamen befruchtet werden können, gegen Samen der eigenen Art ganz oder fast ganz immun sind. Tabelle I repräsentiert einen einzelnen solchen Versuch unter einer größeren Zahl, welche ich angestellt habe. Hier, wie in allen diesen Versuchen, wurden Eier desselben Weibchens

für die Befruchtung mit Samen der eigenen Art wie für Befruchtung mit Seesternsamen benutzt. Die Zahl der Tropfen des zugefügten Samens war für beide Fälle die gleiche, aber die Konzentration des benutzten Seesternsamens war größer als die des Seeigelsamens.

Tabelle V.

Natur der Lösung		Prozentsatz der befruchteten Seeigeleier bei Zusatz von Seesternsamen	Seeigelsamen
100 ccm Seewasser		0%	100%
100 „		0%	0%
100 „ van't Hoffsche Lösung	+ 0,1 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO	0%	50%
100 „	+ 0,2 „ $\frac{n}{10}$ NaHO	3%	20%
100 „	+ 0,3 „ $\frac{n}{10}$ NaHO	80%	0,01%
100 „	+ 0,4 „ $\frac{n}{10}$ NaHO	30%	0%

Die Tabelle zeigt deutlich, daß die Lösungen, welche die maximalen Werte für die Befruchtung der Seeigeleier durch Samen der eigenen Art geben, minimale Werte für die Befruchtung derselben Eier durch Seesternsamen ergeben und vice versa. In Seewasser werden alle Seeigeleier durch Seeigelsamen befruchtet, aber keine durch Seesternsamen. In der van't Hoffschen Lösung, welcher pro 100 ccm der Lösung 0,3 und 0,4 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugefügt wurden, wurden 80 resp. 30% der Eier durch Seesternsamen befruchtet, wenige resp. keine Eier durch Seeigelsamen. Bei Zusatz von

0,2 ccm NaHO werden schon einige Eier durch Seesternsamen befruchtet, während noch ein guter Prozentsatz durch Seeigelsamen befruchtet wird. Die anderen Versuche unterschieden sich von dem hier erwähnten durch die absoluten Zahlen, aber im großen und ganzen fallen sie in dasselbe Schema. Was für die Versuche mit NaHO gilt, gilt auch für die Versuche mit Na_2CO_3. Die Quantität, in welcher eine $\frac{5}{8}$ m Na_2CO_3-Lösung zu 100 ccm der van't Hoffschen Lösung zugesetzt werden muß, damit die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen am besten gelingt, ist zu hoch, um die Befruchtung der Eier desselben Weibchens durch Samen der eigenen Art zu gestatten. Es handelt sich jedoch hierbei nicht um eine direkte Wirkung der CO_3-Ionen, sondern der Hydroxylionen, da die Lösungen von $NaHCO_3$ sich ganz anders verhalten wie die Lösungen von Na_2CO_3.

Tabelle VI.

Natur der Lösung			Prozentsatz der befruchteten Seeigeleier bei Zusatz von Seesternsamen	Seeigelsamen
100 ccm Seewasser			0%	100%
100 „	van't Hoffsche Lösung		0%	0%
100 „		+ 0,05 ccm $\frac{5}{8}$ m Na_2CO_3	40%	0%
100 „		+ 0,1 „ $\frac{5}{8}$ m Na_2CO_3	1%	0%
100 „		+ 0,2 „ $\frac{5}{8}$ m Na_2CO_3	0%	0%
100 „		+ 0,4 „ $\frac{5}{8}$ m Na_2CO_3	0%	0%
100 „		+ 0,05 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	0%	0%
100 „		+ 0,1 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	0%	0%
100 „		+ 0,2 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	0%	0%
100 „		+ 0,4 „ $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$	0%	50%

Bei Zusatz von 0,05 ccm einer $\frac{1}{8}$ m Na_2CO_3-Lösung werden also 40% aller Seeigeleier durch Seesternsamen befruchtet, während in derselben Lösung kein einziges Ei desselben Weibchens durch Seeigelsamen befruchtet wird.

2. Es wäre von Bedeutung, zu wissen, welcher Umstand in der Konstitution des Seewassers für die völlige oder hochgradige Immunität der Seeigeleier gegen Seesternsamen in Seewasser verantwortlich ist. Der Umstand, daß die Konzentration des zugefügten NaHO von entscheidender Bedeutung ist, regt die Frage an, ob das Seewasser keine freien Hydroxylionen enthält, oder ob es sie in ungenügender Konzentration enthält. Leider liegen hierüber keine Messungen vor.

Ich habe nun einige Versuche angestellt, ob nicht durch Zusatz von Na_2CO_3 zu Seewasser die Immunität der Seeigeleier gegen Seesternsamen aufgehoben werden kann. Es stellte sich heraus, daß mehr Seeigeleier unter diesen Umständen befruchtet werden als in normalem Seewasser. Ich hoffe, diese Versuche wieder aufzunehmen, sobald eine Bestimmung der Konzentration der freien Hydroxylionen im Seewasser vorliegt. Ohne eine solche Bestimmung ist ein weiteres planmäßiges Arbeiten kaum möglich.

3. Wie wird die Immunität der Seeigeleier gegen Seesternsamen und Samen der eigenen Art in den verschiedenen Lösungen bewirkt? Darauf vermag ich

keine positive Antwort zu geben. Es ist jedoch sicher, daß diese Immunität nicht durch einen Mangel an Bewegungsenergie der Spermatozoen bedingt ist. So ist beispielsweise die Energie der Bewegungen der Seesternspermatozoen ungewöhnlich groß in einer van't Hoffschen Lösung, der man einen kleinen Betrag $NaHCO_3$ zufügt. Nichtsdestoweniger findet hier keine Befruchtung der Seeigeleier statt, während in den Lösungen mit Zusatz von NaHO, in welchen die Befruchtung wirklich erfolgt, die Energie der Bewegungen geringer ist. Auch leben die Samenkörperchen in der letzteren Gruppe von Lösungen nicht so lange als in den Lösungen mit Zusatz von $NaHCO_3$, in denen die Befruchtung nicht möglich ist. Die Seesternspermatozoen bewegen sich auch lebhaft genug im Seewasser, um die Befruchtung der Eier der eigenen Art auszuführen. Ich dachte daran, daß die Agglutination zwischen Ei und Samen eine Vorbedingung der Befruchtung sei, aber es läßt sich leicht nachweisen, daß bei einem Maximum der Agglutination, wenn nämlich die Eier mit einer dicken Kruste von Samenkörperchen bedeckt sind, die Befruchtung unterbleiben kann, während bei einem viel geringeren Grad der Agglutination viele Eier befruchtet werden können.

Ich warf die Frage auf, ob die künstlichen Lösungen, in denen die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen möglich ist, auf das Ei allein

oder den Samen allein wirken. Zu dem Zweck wurden Seeigeleier ohne Samen in die zur Befruchtung mit Seesternsamen geeignete Lösung gebracht (100 ccm van't Hoffsche Lösung + 0,4 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO). In verschiedenen Intervallen von 10 bis 50 Minuten wurden Proben der Eier herausgenommen und in Seewasser gebracht, dem frischer Seesternsamen zugefügt wurde. In keinem Falle wurde ein Ei befruchtet. Dieselben Eier wurden aber zu derselben Zeit befruchtet, wenn man den Seesternsamen statt in Seewasser in 100 ccm van't Hoffsche Lösung + 0,4 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zusetzte. Die Seeigeleier besitzen also ihre absolute oder relative Immunität gegen Seesternsamen nur, so lange sie in der geeigneten Lösung sich befinden. Ganz ebenso fielen die entsprechenden Versuche aus, in denen der Seesternsamen allein mit der obigen Lösung vorbehandelt wurde und dann zu den Eiern im Seewasser zugefügt wurde. Es fand hierbei niemals eine Befruchtung statt. Dieser negative Ausfall der Versuche erlaubt uns nicht, eine bestimmte Antwort auf die oben aufgeworfene Frage zu geben. Es ist unter diesen Umständen auch nicht möglich, weiteren Aufschluß über die Rolle dieser Lösungen bei der Befruchtung zu geben[1]).

[1]) Der Umstand, daß der Seesternsamen die Eier der eigenen Art besser in natürlichem Seewasser befruchtet als in den künstlichen Lösungen, die zur Bastardierung benutzt

4. Bei den Versuchen der Pathologen über Immunitätserscheinungen handelt es sich um die Wirkung von Stoffen, die offenbar in geringer Konzentration vorhanden sind. Auch in unseren Versuchen sind die Konzentrationsunterschiede, welche die Immunität des Seeigeleies gegen die eine oder andere Art der Samenkörperchen bedingen, sehr klein. Selbst wenn wir voraussetzen, daß die van't Hoffsche Lösung völlig neutral ist, und daß das zugefügte Alkali (NaHO) völlig dissoziiert ist, so liegt die Konzentration der Hydroxylionen in der van't Hoffschen Lösung, in welcher die Seeigeleier durch den Samen der eigenen Art befruchtet werden, zwischen $\frac{n}{10000}$ und $\frac{n}{5000}$, während sie für die Befruchtung derselben Eier mit Seesternsamen $\frac{n}{5000}$ bis $\frac{n}{2500}$ beträgt. Diese Konzentrationsunterschiede sind von einer so geringen Größenordnung, daß sie bestehen können, ohne das Leben zu gefährden oder zu verkürzen. Das aber ist ja auch, wie wir annehmen, charakteristisch für die Stoffe, welche die Immunität bewirken. Während aber die Immunitätsstoffe im allgemeinen unbekannt sind, haben wir es in diesen Versuchen mit einem chemisch wohlbekannten Körper zu tun.

---

wurden, spricht, wie schon oben erwähnt, für die Annahme, daß die Lösung zum Teil, wenn nicht vornehmlich, auf das Ei wirkt.

VII. Bemerkungen für die Wiederholung und Weiterführung dieser Versuche.

Wer die hier mitgeteilten Versuche wiederholen will, wird am besten folgende Regel befolgen. Man stelle sich eine Reihe von van't Hoffschen Lösungen[1]) her, deren osmotischer Druck und Ca-Gehalt dem des Seewassers entsprechen muß, aus dem die Tiere stammen. In 100 ccm dieser Lösung werden dann je 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 und 0,5 ccm $\frac{n}{10}$NaHO zugefügt. Manchmal wird es auch nötig sein, noch Lösungen mit 0,25 und 0,35 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO herzustellen. Dann bringe man in jede dieser Lösungen einen Tropfen konzentrierten Samens, wie er (ohne Beimischung von Seewasser) aus dem reifen Seesternhoden ausströmt, und füge einen bis drei Tropfen konzentrierter Eier zu. Es ist rätlich, die Beimischung von Seewasser zu der Lösung tunlichst zu vermeiden. Dann sorgt man für eine gründliche Vermischung der Eier und Samenkörperchen, was durch leichtes Schütteln des Seewassers oder mittels einer Pipette geschehen kann. Durch Kontrollversuche mit Eiern in denselben Lösungen, aber ohne Samenzusatz, überzeuge man sich, daß die Natur der Lösung und die mechanische Erschütterung keine Membranbildung und Entwicklung veranlassen.

[1]) Ich brauche kaum zu bemerken, daß die Lösungen aus chemisch reinen Salzen und mit der größten Sorgfalt angefertigt wurden. Dasselbe gilt für das destillierte Wasser.

Hat man die optimale Lösung für die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen gefunden, so kann man mit Erfolg eine Reihe von Befruchtungsversuchen mit demselben Samen und denselben Eiern in dieser Lösung anstellen. Häufig aber stellt sich ein Zeitpunkt ein, in dem die Befruchtung plötzlich nicht mehr gelingt. Ich habe in solchen Fällen oft gefunden, daß, wenn man dann eine Lösung mit etwas mehr NaHO benutzt, die Befruchtung wieder stattfindet.

Eine Ursache des Mißlingens dieser Versuche ist sehr auffallend und verdient deshalb Erwähnung. Man bemerkt oft, daß die trübe Suspension des Samens in der Lösung sich ziemlich plötzlich klärt. Das beruht auf einer Fällung des Samens. Wenn das eintritt, so findet keine Befruchtung statt. Ich vermag den Grund für diese Beziehung nicht anzugeben.

Auch die Temperatur scheint für das Gelingen dieser Versuche von Bedeutung zu sein. Ich arbeitete meist bei einer Temperatur von 14 bis 18° C. Wenn die Temperatur am Nachmittag rasch in die Höhe ging, so versagten die Versuche oft mit denselben Eiern und denselben Spermatozoen, mit denen sie vorher gelangen. Ich fand, daß in einer Reihe von Fällen die Versuche wieder gelangen, wenn man die Lösung um einige Grad abkühlte. Die Rolle der Temperatur bei diesen Versuchen muß weiter untersucht werden.

Die Konzentration des Samens ist eine wichtige Variable bei diesen Versuchen. Die Konzentration muß höher sein, als für die Befruchtung der Seeigeleier durch Samen der eigenen Art nötig ist. Oft ist das Mißlingen der Versuche dadurch bedingt, daß man zu wenig Samen zugesetzt hat. Es ist allerdings zu beachten, daß es eine obere Grenze für die Konzentration des Samens gibt, nämlich wo durch Sauerstoffzehrung durch den Samen oder das Abgeben schädlicher Stoffe durch denselben die Befruchtung und Entwicklung gehemmt wird.

Im allgemeinen leidet der Same früher als die Eier. Es ist rätlich, stets mit frischem Material zu arbeiten.

VIII. Die Entwicklung und Lebensdauer der Bastardlarven zwischen Seeigel und Seestern.

1. Da dieser Aufsatz sich in erster Linie an Physiologen und Pathologen wendet, so will ich nur diejenigen morphologischen Eigentümlichkeiten der Bastarde von Seeigeleiern und Seesternsamen erwähnen, welche von physiologischem oder medizinischem Interesse sind. Die Furchung der hybridisierten Eier ist im allgemeinen regelmäßig. Ob in Einzelheiten, z. B. dem Eintritt der Mikromerenbildung, Abweichungen bestehen, habe ich nicht ermittelt. Was mich wesentlich interessierte, war die Frage, ob diese Larven wie die reine Seeigellarve ein Skelett bilden oder ob das

wie bei der reinen Seesternlarve unterbleibt. Die Versuche ergaben, daß eine Skelettbildung erfolgt. Allerdings trat diese Skelettbildung meist später ein als bei den reinen Seeigellarven. Die Skelettbildung schien auch nicht zu einem so vollkommenen Skelett zu führen wie bei den Seeigellarven der reinen Zucht. Ob aber diese Verzögerung resp. Unvollständigkeit der Skelettbildung darauf beruht, daß das Seesternspermatozoon Stoffe in das Ei trägt, welche die Skelettbildung erschweren, oder ob es sich nur darum handelt, daß die Entwicklung im ganzen[1]) verzögert ist, kann ich einstweilen nicht entscheiden.

2. Was aber in diesen Versuchen auffallend ist, ist der Umstand, daß die Bastarde zwischen Seeigel und Seestern eine viel geringere mittlere Lebensdauer haben, d. h. in den ersten 48 Stunden in größerer Zahl sterben, als die reinen Larven der Seeigel oder die reinen Larven der Seesterne. Es ist nichts Seltenes, daß 50 bis 80% der Seeigeleier durch den Seesternsamen in der geeigneten Lösung befruchtet werden. Wenn man dann die Furchung verfolgt, so ist man überrascht, daß dieselbe nicht bei allen Eiern eintritt. Nach 24 Stunden findet man eine große Zahl schwim-

[1]) Die Larven zeigen also in bezug auf die Skelettbildung das Überwiegen des Eies über das Spermatozoon. Daß bei Bastardierungen während der ersten Entwicklungsstadien der Einfluß des Eies über den des Spermatozoons überwiegt, scheint nach den Beobachtungen von Driesch, Vernon, Whitman, Boveri eine allgemeine Regel zu sein.

mender Blastulae, obwohl dieselbe oft schon erheblich kleiner ist als die Zahl der befruchteten Eier, weil einige unter den letzteren eben schon absterben, ehe sie das Blastulastadium erreichen. Am zweiten Tage aber findet man, daß eine große Zahl der Larven gestorben ist, und daß nur eine beschränkte Zahl ins Gastrulastadium geht. Noch viel kleiner ist die Zahl der Larven, die den zweiten Tag überleben. Man kann schließlich noch am neunten Tage Larven mit rudimentärer Skelettbildung am Leben finden, aber die Ausbeute an solchem Material ist relativ klein.

Ich dachte erst daran, daß die künstlichen Lösungen die Eier schädigen, und so stellte ich gleichzeitig Versuche an, in denen die Seeigeleier mit Samen der eigenen Art befruchtet wurden. Als Lösung diente 100 ccm van't Hoffsche Lösung + 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO. Da nur wenig Seeigeleier in dieser Lösung durch Samen der eigenen Art befruchtet werden, so stellte ich gleichzeitig eine Reihe derselben Lösungen her, denen jedoch 0,2, 0,4, 0,8 ccm oder mehr $\frac{1}{8}$ m $NaHCO_3$ zugesetzt wurde. In den letzteren Lösungen wurden fast alle Eier mit Seeigelsamen befruchtet. Es stellte sich nun heraus, daß die mit Seeigelsamen befruchteten Seeigeleier sich in diesen künstlichen Lösungen gut entwickelten und normale Skelette bildeten. Die Sterblichkeit war eine geringe und jedenfalls nicht größer als bei der Benutzung von reinem Seewasser.

Diese Versuche wurden oft wiederholt und ergaben meist dasselbe Resultat. Da für die Parallelversuche, in denen die Sterblichkeit der mit Seeigelsamen und Seesternsamen befruchteten Eier mit der der Seeigellarven reiner Zucht verglichen wurde, nicht nur identische Lösungen, sondern auch die Eier ein und desselben Weibchens benutzt wurden, so bleibt kein Zweifel übrig, daß die hier beobachteten Unterschiede der Sterblichkeit auf Unterschiede in der Zusammensetzung oder Wirkung beider Arten von Spermatozoen beruhen.

3. Dieser Umstand führt uns auf ein sehr wichtiges Problem der Biologie, nämlich die Frage nach der Lebensfähigkeit und dem natürlichen Tode. Ich habe schon früher darauf aufmerksam gemacht, daß die unreifen Eier sowohl wie die sich entwickelnden Eier des Seesterns in demselben Seewasser nicht so rasch zugrunde gehen als die reifen Eier, welche nicht zur Entwicklung gebracht werden. Der Entwicklungsprozeß selbst hemmt den Tod oder die Wirkung einiger Umstände, auf denen der Tod in diesen Fällen beruht. Ich habe nun in all meinen Versuchen über künstliche Parthenogenese auch darauf geachtet, ob die Lebensfähigkeit der ohne Spermatozoen sich entwickelnden Eier ebenso hoch ist wie bei den Eiern, in welche ein Samenkörperchen eintritt. Das ist nun bei Seeigeleiern und Annelideneiern entschieden nicht der Fall. Bringt man die Eier eines See-

igels parthenogenetisch zur Entwicklung (durch Wasserentziehung), so findet man eine Reihe Larven die ebenso lange leben, wie die durch Befruchtung mit einem Spermatozoon hervorgebrachten Larven, und ich bin geneigt, anzunehmen, daß es gelingen wird, eine kleine Zahl dieser parthenogenetischen Larven zu geschlechtsreifen Tieren zu züchten. Dagegen besteht ein Unterschied in der mittleren Sterblichkeit der parthenogenetisch und der durch Befruchtung zur Entwicklung gebrachten Eier. Viel mehr Eier der ersteren Art sterben in den früheren Entwicklungsstadien, während der Tod bei den befruchteten Eiern auf den frühen Entwicklungsstadien viel seltener ist. Ich habe mich durch besondere Versuche davon überzeugt, daß dieser Unterschied nicht durch die Behandlung der Eier mit den Mitteln bedingt ist, welche künstliche Parthenogenese hervorbringen [1]). Wir müssen also wohl hieraus folgern, daß das Spermatozoon der eigenen Art Stoffe oder Bedingungen in das Ei führt, welche die Lebensfähigkeit während der ersten Entwicklungstadien erhöhen.

Die Sterblichkeit der Strongylocentrotuseier, welche mit Seesternsamen befruchtet werden, ist nun viel größer als die Sterblichkeit der parthenogenetisch zur Entwicklung gebrachten Eier derselben Art. Das legt den Gedanken nahe, daß das Seesternspermatozoon

[1]) Diese Versuche sind noch nicht veröffentlicht.

neben den entwicklungserregenden Substanzen oder Bedingungen auch solche Stoffe oder Bedingungen in das Ei trägt, welche das letztere schädigen. Der Schluß ist wahrscheinlich richtig, aber es ist doch noch ein möglicher Irrtum in Betracht zu ziehen. Bei der Befruchtung der Seeigeleier mit Seesternsamen wird viel Samen erfordert. Das fördert die Bakterienentwicklung und wirkt als sauerstoffzehrendes Mittel. Ich habe jedoch gefunden, daß, wenn man 30 Minuten nach erfolgter Besamung mit Seesternsamen den Samen abgießt und die Seeigeleier so viel als möglich frei von Samen in reines Seewasser zurückbringt, die Sterblichkeit doch groß bleibt.

Der Umstand, daß die Art und Weise der Entwicklungserregung von solcher Bedeutung für die Lebensfähigkeit der Eier ist, eröffnet der Biologie ein schönes Feld der Forschung, nämlich Mittel zu finden, durch welche die Sterblichkeit des sich entwickelnden Eies verringert werden kann.

Zum Schlusse möchte ich kurz die Frage berühren, ob die in dieser Arbeit mitgeteilte Methode der Hybridisation von Tierformen, welche unter natürlichen Bedingungen nicht oder nur schwer zur Bastardierung gebracht werden können, einer weiteren Anwendung fähig ist. Diese Frage muß wohl bejaht werden. Es ist mir gelungen, die Eier eines anderen Seeigels, Strongylocentrotus franciscanus, ebenfalls mit dem Samen von Asterias ochracea zu befruchten. Die

Lösungen, in welchen das gelang, waren nahezu identisch mit den Lösungen, in welchen auch die Befruchtung von Strongylocentrotus purpuratus mit dem Samen desselben Seesterns erfolgte. Es ist bemerkenswert, daß, wie ich schon erwähnte, nach allen meinen bisherigen Beobachtungen die Eier von Strongylocentrotus franciscanus in Seewasser absolut immun gegen den Samen von Asterias ochracea sind, selbst wenn das Wasser (in Pacific Grove) dem Ozean direkt entnommen wurde.

Ich habe ferner versucht, die Eier des Seeigels mit dem Samen anderer Seesterne (Asterina) zu befruchten, aber bis jetzt ohne Erfolg, möglicherweise, weil Asterina zu der Zeit der Versuche nicht geschlechtsreif war. Auch Kreuzungsversuche zwischen den Eiern des Seeigels und Annelidensamen führten zwar zu einer Membranbildung der Eier, aber zu keiner Furchung. Alle diese Versuche sollen weitergeführt werden.

Es ist auch unter diesen Umständen verfrüht, darüber zu spekulieren, ob nicht in einer früheren Epoche das Seewasser eine etwas andere Konstitution, besonders in bezug auf die Konzentration der freien Hydroxylionen, besessen habe als jetzt, und ob unter diesen Umständen nicht Hybridisationen unter natürlichen Bedingungen möglich gewesen seien, die heute ausgeschlossen sind. Man nimmt an, daß der Kohlensäuregehalt der Luft nicht stets der gleiche gewesen

sei, und entsprechend mag wohl auch das Gleichgewicht zwischen Karbonaten und Bikarbonaten des Meeres geschwankt haben. Sollte es sich herausstellen, daß durch künstliche Lösungen neue Hybridisationen in weiterem Umfange möglich sind, so könnte vielleicht die Frage nach etwaigen Änderungen in der Beschaffenheit des Seewassers in verschiedenen Epochen der Erdgeschichte für gewisse Probleme der Deszendenztheorie von Bedeutung werden.

IX. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Eier von Strongylocentrotus purpuratus konnten mit dem Samen der eigenen Art leicht befruchtet werden in Seewasser oder in einer van't Hoffschen Lösung (siehe Abschnitt II dieser Abhandlung), der man pro 100 ccm der Lösung 0,1 bis 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO oder 0,4 bis 2,0 ccm $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$ zusetzte.
2. In den sub 1 erwähnten Lösungen konnten die Eier desselben Seeigels gar nicht oder nur in sehr geringer Zahl durch den Samen eines Seesterns (Asterias ochracea) befruchtet werden.
3. Dagegen wurden die Seeigeleier rasch und in großer Zahl durch Samen des erwähnten Seesterns in einer van't Hoffschen Lösung befruchtet, wenn man zu 100 ccm der Lösung 0,3 bis 0,4 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zufügte.

4. In der sub 3 erwähnten Lösung konnten die Eier von Strongylocentrotus purpuratus nicht oder nur in geringer Zahl durch den Samen der eigenen Art befruchtet werden.
5. Neben dem NaHO (resp. den Hydroxylionen) erwiesen sich als unerläßlich für die Befruchtung wie für die Hybridisation der Seeigeleier die Ca- und Na-Ionen, während von Anionen außer HO — Cl-Ionen genügten.

XXI.

Über die Reaktion des Seewassers und die Rolle der Hydroxylionen bei der Befruchtung der Seeigeleier[1]).

Nachtrag zur Abhandlung über die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen[2]).

Bei den vor kurzem in dieser Zeitschrift veröffentlichten Versuchen über die Befruchtung der Seeigeleier durch Samen der eigenen Art hatte es sich herausgestellt, daß ich zu 100 ccm der künstlichen Lösung von NaCl und $CaCl_2$, in der diese Befruchtung vorgenommen wurde, ca. 0,09 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO oder ca. 0,8 ccm $\frac{5}{8}$ m $NaHCO_3$ pro 100 ccm der künstlichen Lösung zusetzen mußte. Ohne Zusatz von $NaHCO_3$ oder NaHO fand die Befruchtung der Eier nicht statt. Ich sprach damals die Vermutung aus, daß das NaHO sowohl wie das $NaHCO_3$ nur zur Neutralisation von Säure dienten, daß es aber unwahrscheinlich sei, daß zur normalen Befruchtung der Seeigeleier durch Samen der eigenen Art freie Hydroxylionen nötig seien. Ich habe seither den Gegenstand weiter verfolgt und diese Vermutung bestätigt gefunden.

---

[1]) Pflügers Archiv für die ges. Physiologie, Bd. 99. 1903.

[2]) Siehe Pflügers Archiv, Bd. 99, S. 323.

Normales Seewasser des Ozeans, in dem die Befruchtung der Seeigeleier durch den Samen der eigenen Art rasch erfolgt, ergibt mit Phenolphthaleïn keine Spur von Rotfärbung. Mein Kollege Herr Dr. Cottrell war so freundlich, eine Probe von Seewasser aus dem Hafen von San Franzisko auf die Konzentration der H-Ionen mittels der Gaskette zu untersuchen. Es ergab sich, daß die Konzentration der Wasserstoffionen nicht nur nicht kleiner als in reinem Wasser war, sondern um ungefähr eine Zehnerpotenz höher. Wir dürfen also das normale Seewasser als eine nicht-alkalische und nahezu neutrale Flüssigkeit ansehen. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, daß der Kohlensäuregehalt der umgebenden Luft resp. die CO_2-Produktion durch Seetiere und die Assimilationstätigkeit der grünen Pflanzen Variationen im relativen Gehalt an Bikarbonat und Karbonat bedingen, die natürlich auch die Reaktion des Seewassers beeinflussen. Auch die Zerstäubung des Wassers in der Brandung kann eine Verminderung des Gehaltes an Kohlensäure und damit eine Erhöhung der Konzentration der Karbonate und der Hydroxylionen bedingen.

Eine Analyse der von mir gebrauchten Lösungen ergab einen sehr schwachen Säuregehalt. Zur Neutralisation von 100 ccm van't Hoffscher Lösung war ca. 0,04 ccm $\frac{n}{10}$ KHO erforderlich. Wir dürfen es danach als sicher ansehen, was ich in meiner Arbeit nur als Vermutung aussprach: daß für die Befruch-

tung der Seeigeleier durch eigenen Samen keine freien Hydroxylionen (resp. nicht in höherer Konzentration, als sie in destilliertem Wasser vorhanden sind) erforderlich sind.

Für die Befruchtung der Seeigeleier mit Seesternsamen sind dagegen freie Hydroxylionen in ziemlich beträchtlicher Konzentration, nämlich $\frac{3}{10000}$ n, erforderlich. Der Umstand, daß diese Konzentration so viel größer ist als die der Hydroxylionen im Seewasser, erklärt es wohl, daß die Eier von Strongylocentrotus purpuratus durch den Samen von Asterias ochracea in normalem Seewasser im allgemeinen nicht befruchtet werden können.

Die Tatsache, daß das Seewasser nicht als eine im physikalisch-chemischen Sinne alkalische Lösung bezeichnet werden darf, und daß das gleiche auch, nach den Untersuchungen von Friedenthal[1]) und Fraenckel[2]), für das Blut der Fall zu sein scheint, macht es nötig, neue Untersuchungen über den Einfluß alkalischer Lösungen auf die Lebenserscheinungen anzustellen. Ich habe damit begonneu und hoffe in kurzem in der Lage zu sein, die Resultate dieser Versuche mitzuteilen.

[1]) Zeitschrift für allgemeine Physiologie, Bd. 1, S. 56. 1902.
[2]) Pflügers Archiv, Bd. 96, S. 601. 1903.

XXII.

Weitere Versuche über heterogene Hybridisation bei Echinodermen [1]).

I. Einleitung.

Während die bisher vorliegenden erfolgreichen Hybridisationsversuche bei Echinodermen sich nur auf verschiedene Arten derselben Familie beziehen, habe ich, wie ich glaube, im vorigen Jahre zum ersten Male einwandsfrei den Nachweis geliefert, daß auch durch Vermischung der Geschlechtszellen der Vertreter verschiedener Familien von Echinodermen lebende Larven erzeugt werden können [2]). Während ich damals nur über die erfolgreiche Kreuzung zwischen Seeigel (Strongylocentrotus) ♀ und einem Seestern (Asterias ochracea) ♂ berichten konnte, habe ich mich seitdem überzeugt, daß die Eier des erwähnten Seeigels mit dem Samen jedes beliebigen Seesterns und außerdem mit dem Samen eines Ver-

[1]) Pflügers Archiv für die ges. Physiologie, Bd. 104. 1904.

[2]) Loeb, University of California Publications, Physiology vol. 1, S. 1, 39 und 85. — Dieses Archiv, Bd. 99, S. 323 und 637. (Die physiologische Abteilung der University of California Publications wird den Fachgenossen auf Wunsch gern zugeschickt.)

treters einer anderen Echinodermenfamilie, nämlich der Schlangensterne, erfolgreich befruchtet werden können. Ich glaube sogar mich von der Möglichkeit überzeugt zu haben, daß auch die Befruchtung der Seeigeleier mit dem Samen der Vertreter einer dritten Familie, nämlich der Holothurien, gelingt. Da ich aber diese Versuche nicht zu meiner völligen Zufriedenheit habe erledigen können, so soll eine Beschreibung derselben in dieser Abhandlung unterbleiben.

Um nun durch einen kurzen Ausdruck die Hybridisation der Vertreter verschiedener Familien zu bezeichnen, soll dieselbe hier als heterogene Hybridisation erwähnt werden. Die Kreuzung der Vertreter derselben Familie mag entsprechend als homogene Hybridisation bezeichnet werden. Für die Befruchtung der Eier einer Art mit dem Samen derselben Art soll der Ausdruck reine Befruchtung gewählt werden.

Es ist nun wohl bekannt, daß bereits die homogenen Hybridisationen auf große Schwierigkeit stoßen. Die Möglichkeit heterogener Hybridisationen ist mit Recht allgemein angezweifelt worden. Sehen wir uns nach den Gründen dieser Schwierigkeit um, so sind meines Wissens bisher nur zwei Gründe dieser Art erwähnt worden, nämlich erstens mechanische Schwierigkeiten, welche dem Eindringen eines Spermatozoons in das Ei einer fremden Art im Wege stehen, und zweitens der Umstand, daß die Körpersäfte eines Tieres für die Zellen einer nicht verwandten Form im allge-

meinen giftig sind. Die letztere Möglichkeit würde vornehmlich für die heterogene Hybridisation in Betracht kommen und ist auch von v. Dungern als Grund dafür angegeben worden, daß die Befruchtung der Seesterneier durch Seeigelsamen unmöglich sei. Was die mechanischen Hindernisse anbetrifft, so hat man übermäßige Größe oder ungeeignete Form der Spermatozoen angeführt, was ja im Falle von Eiern, welche eine Mikropyle besitzen, durchaus plausibel ist. Ich glaube aber, daß die bisher von mir mitgeteilten Versuche zeigen, daß eine heterogene Hybridisation, welche unter normalen Bedingungen unmöglich ist oder nur ausnahmsweise erfolgt, durch eine geringe Änderung der chemischen Konstitution der umgebenden Lösung, nämlich der Reaktion derselben, in großartigem Maßstab gelingt. Während in normalem Seewasser die Befruchtung des Seeigeleies durch den Samen von Asterias nur ausnahmsweise und bei vereinzelten Eiern erfolgt, gelingt dieselbe in alkalisch gemachter van't Hoffscher Lösung. Dasselbe gilt aber, wie ich dieses Jahr gefunden habe, auch für alkalisch gemachtes Seewasser, und nicht nur für die Befruchtung des Seeigeleies mit dem Samen von Asterias, sondern jedes beliebigen Seesternes und der Schlangensterne. Es scheint sich also hier um ein allgemeines Gesetz der heterogenen Hybridisation in der Gruppe der Echinodermen zu handeln, vorausgesetzt, daß als Ei das Seeigelei benutzt wird.

II. Heterogene Hybridisation in alkalischem Seewasser.

Es war aus verschiedenen Gründen wünschenswert, die künstlichen Lösungen durch natürliches Seewasser zu ersetzen. Bei dem Versuch, dem Seewasser, dessen Reaktion, wie früher erwähnt, neutral ist, eine alkalische oder saure Reaktion zu geben, muß berücksichtigt werden, daß dasselbe in den Bikarbonaten und Diphosphaten Regulatoren besitzt, welche seine Reaktion neutral zu halten bestrebt sind. Wenn wir also einen kleinen Betrag von NaHO zum Seewasser zusetzen, so wird ein Teil der Hydroxylionen neutralisiert, und die Konzentration der Hydroxylionen im Seewasser ist geringer als dem Zusatz der NaHO-Lösung sonst entsprechen würde. Herr Dr. Cottrell hat es auf mein Ersuchen unternommen, die Konzentration der freien Wasserstoffionen in angesäuertem und alkalisch gemachtem Seewasser mit der Gaskette zu bestimmen, und die Resultate dieser Untersuchung, welche für die Physiologie der Körpersäfte von allgemeiner Bedeutung ist, sollen später veröffentlicht werden.

Was nun die Methode der Hybridisationsversuche betrifft, so ist zu bemerken, daß nur solches Seewasser benutzt wurde, das vorher durch Erhitzen auf 60° von allen lebenden Spermatozoen befreit war. Diese Vorsichtsmaßregel ist absolut nötig, und ich

muß nach meinen Erfahrungen darauf bestehen, daß Hybridisationsversuche, in denen diese Vorsichtsmaßregel nicht angewendet wird, im allgemeinen als unbrauchbar oder unzuverlässig anzusehen sind. Ebenso nötig ist es für die Sterilität der Instrumente und Hände des Experimentators und namentlich der Oberfläche der Tiere Sorge zu tragen. Es ist absolut nötig, die Tiere mit einem kräftigen Strom von Süßwasser zu reinigen. Das ist um so mehr geboten, wenn die Männchen, wie es oft der Fall ist, den Samen spontan ins Seewasser entleeren. Ich habe es mir zur Regel gemacht, in solchen Fällen und mit solchem Material überhaupt keine Versuche anzustellen. Außer den Vorsichtsmaßregeln gegen Infektion der Kulturen mit dem Samen derselben Art, von der die Eier stammen, sind noch Vorsichtsmaßregeln gegen die Möglichkeit nötig, daß eine parthenogenetische Entwicklung der Eier vorliegt. Man schützt sich gegen diese Fehlerquelle durch Kontrollversuche, wie ich schon früher angeführt habe und wovon später noch die Rede sein wird. Wir wollen nun zur Beschreibung der Versuche übergehen.

Zu je 100 ccm sterilierten Seewassers wurden je 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 und 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugefügt; je vier bis sechs Tropfen Seeigeleier (Strongylocentrotus purpuratus ist die einzige Seeigelform, die in dieser Arbeit in Betracht kommt) wurden in jede Lösung gebracht, und dann wurde der Samen

zugefügt. Im allgemeinen wurden die Eier und der Samen von mehr als einem Tier benutzt.

Zu den Eiern von Strongylocentrotus, die sich in diesen Lösungen befanden, wurde der Samen von Asterias capitata zugefügt. Jede Lösung erhielt genau den gleichen Betrag von Samen. Nach zehn Minuten hatte bereits eine Anzahl Eier in dem Seewasser, das mehr als 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO pro 100 ccm Seewasser enthielt, die typische Befruchtungsmembran gebildet. Nach zwei Stunden ergab eine Zählung der befruchteten Eier das Resultat, welches in Tabelle I erwähnt ist.

Tabelle I.

Befruchtung von Strongylocentrotuseiern mit Samen von Asterias capitata.

Natur der Lösung	Prozentsatz der befruchteten Eier nach 2 Stunden
100 ccm normalen Seewassers	0%
100 „ „ „ + 0,25 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO	0%
100 „ „ „ + 0,5 „ $\frac{n}{10}$ „	0%
100 „ „ „ + 0,75 „ $\frac{n}{10}$ „	0,1%
100 „ „ „ + 1,0 „ $\frac{n}{10}$ „	ca. 20%
100 „ „ „ + 1,25 „ $\frac{n}{10}$ „	über 50%
100 „ „ „ + 1,5 „ $\frac{n}{10}$ „	ca. 10%
100 „ „ „ + 1,75 „ $\frac{n}{10}$ „	ca. 5%
100 „ „ „ + 2,0 „ $\frac{n}{10}$ „	ca. 5%

Nach 24 Stunden waren die Eier, die sofort befruchtet worden waren, bereits im Blastulastadium. In normalem Seewasser fand ich kein befruchtetes Ei. In 100 ccm Seewasser + 0,25 NaHO fand ich ein befruchtetes Ei; in 0,5 NaHO waren ca. 2% der Eier befruchtet, aber sie befanden sich in sehr frühen Furchungsstadien, viele im zweiten bis vierten Zellenstadium, ein Beweis, daß die Befruchtung hier sehr spät eingetreten war. In 100 ccm Seewasser + 0,75 NaHO war die Mehrzahl der Eier befruchtet, aber nur ca. 2% hatten das Blastulastadium erreicht. In den Lösungen mit mehr NaHO war eine Entwicklung der Eier erfolgt, aber die Zahl der befruchteten Eier hatte nicht zugenommen. Vielfache Wiederholungen desselben Versuches mit dem Samen von Asterias capitata ergaben ungefähr dasselbe Resultat.

Wurde der Same des zwanzigarmigen Seesterns (Pycnopodia spuria) gewählt, so war die Zahl der befruchteten Eier erheblich geringer. Auch hier trat die Befruchtung bei höherem Grade der Alkalinität in den ersten zehn Minuten ein. Tabelle II beschreibt einen solchen Versuch.

Auch am nächsten Morgen fanden sich in dem normalen Seewasser und in den Lösungen mit 0,25 und 0,5 NaHO keine befruchteten Eier. Die Eier, die am ersten Tage befruchtet waren, hatten sich entwickelt. Ich war erst der Meinung, daß vielleicht der Same von Pycnopodia nicht so reif sei wie der

Tabelle II.

Befruchtung der Eier von Stongylocentrotus mit dem Samen von Pycnopodia spuria.

Natur der Lösung	Prozentsatz der befruchteten Eier 2 Stunden und 20 Min. nach der Befruchtung
100 ccm normalen Seewassers	0%
100 „ „ „ + 0,25 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO	0%
100 „ „ „ + 0,5 „ $\frac{n}{10}$ „	0%
100 „ „ „ + 0,75 „ $\frac{n}{10}$ „	0%
100 „ „ „ + 1,0 „ $\frac{n}{10}$ „	0,5%
100 „ „ „ + 1,25 „ $\frac{n}{10}$ „	2%
100 „ „ „ + 1,5 „ $\frac{n}{10}$ „	2%
100 „ „ „ + 1,75 „ $\frac{n}{10}$ „	0,5%
100 „ „ „ + 2,0 „ $\frac{n}{10}$ „	0%

von Asterias, und daß das die relativ geringe Zahl von Befruchtungen erkläre. Aber sechs Wochen hindurch wiederholte ich diese Versuche zu verschiedenen Zeiten immer mit demselben Erfolge. In den meisten Fällen benutzte ich auch den Samen verschiedener Männchen. Es dürfte sich also wohl darum handeln, daß der Same von Pycnopodia sich nicht so leicht mit dem Ei von Strongylocentrotus vereinigt oder dasselbe befruchtet wie der von Asterias capitata.

Versuche mit dem Samen einer anderen Gruppe von Seesternen, nämlich Asterina, bestätigen diese Vermutung. Ich erhielt den Samen von Asterina im Zustand der höchsten Reife. Nichtsdestoweniger war die Ausbeute an Strongylocentrotuseiern, welche durch den Samen der Asterinaart befruchtet wurden, noch kleiner als im Falle der Anwendung von Pycnopodiasamen. Im besten Falle wurden etwa 1% der Eier befruchtet. Die Befruchtung erfolgte hier ebenfalls am besten in 100 ccm Seewasser mit 1,0 bis 1,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO. Die befruchteten Eier entwickelten sich. Ich dachte nun daran, daß vielleicht der Verwandtschaftsgrad hier eine Rolle spiele. Das aber scheint dadurch widerlegt zu werden, daß die Befruchtung der Seeigeleier mit dem Samen eines Schlangensternes fast ebenso leicht erfolgt wie die mit Asteriassamen, obwohl doch morphologisch Asterina und Asterias einander näher stehen als Asterina und die Schlangensterne, die ja einer anderen Familie angehören. Der Schlangenstern, um den es sich hier handelt, kann in Pacific Grove, wo diese Versuche ausgeführt wurden, nur bei sehr tiefer Ebbe erlangt werden. Infolgedessen wurden diese Versuche früher angestellt als die anderen, eben mitgeteilten, und sie sind mit denselben deshalb nicht ganz vergleichbar, weil ich bei den Versuchen mit dem Schlangensternsamen Na_2CO_3 statt des NaHO zusetzte. Ich fand nun, daß nicht selten 20—50% der Eier von Stron-

gylocentrotus durch den Samen der Schlangensterne befruchtet wurden und daß die optimale Konzentration der Hydroxylionen für diese Hybridisation niedriger ist als in den Versuchen mit den Seesternen.

Bei meinen im vorigen Jahre veröffentlichten Hybridisationsversuchen war nur der Same von Asterias ochracea benutzt worden. Da ich aber damals fast nur mit künstlichen Lösungen arbeitete, so wiederholte ich dieses Jahr diese Versuche mit alkalisch gemachtem Seewasser. Bei Zusatz von 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm Seewasser wurden bis zu 50% und mehr Eier von Strongylocentrotus durch Ochraceasamen in weniger als zehn Minuten befruchtet. Bei Zusatz von 0,5 oder noch weniger NaHO zu 100 ccm Seewasser trat im allgemeinen während der ersten 24 Stunden keine Befruchtung ein. Dasselbe gilt für normales Seewasser, das aus dem Ozean geschöpft war, obwohl ich im vorigen Jahr in solchen Fällen gelegentlich einige Befruchtungen beobachtete. Wir dürfen es deshalb wohl als ein allgemeines Resultat bezeichnen, daß, wenn man 1 bis 2 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm normalen Seewassers zusetzt, die Eier eines Seeigels (Strongylocentrotus) durch den Samen vieler, vielleicht aller Seesterne in etwa 10—30 Minuten befruchtet werden. Der Prozentsatz der Eier, die so befruchtet werden können, ist relativ hoch für den Samen von Asterias ochracea und capitata, ist viel

kleiner für den Samen des zwanzigstrahligen Seestern (Pycnopodia spuria) und ist sehr klein für Asterina. Dagegen ist der Prozentsatz der befruchteten Eier und Larven groß bei der Befruchtung derselben Eier mit dem Samen eines Schlangensternes. Es ist nicht wahrscheinlich, daß diese Unterschiede nur von dem verschiedenen Reifezustand dieser Samen herrühren.

III. Hybridisation in neutralem und saurem Seewasser.

Im vorigen Jahre hatte ich, wie oben erwähnt, wiederholt beobachtet, daß Eier von Strongylocentrotus ausnahmsweise auch in normalem Seewasser, das aus dem Ozean in Pacific Grove geschöpft war, durch den Samen von Asterias ochracea befruchtet werden konnten. Die Zahl der so befruchteten Eier war stets sehr klein, etwa ein Ei unter 10000. Es fiel mir damals schon auf, daß die Befruchtung in normalem Seewasser relativ spät, meist viele Stunden nach dem Samenzusatz, eintrat, während die Befruchtung derselben Eier durch denselben Samen in der alkalischen van't Hoffschen Lösung in weniger als $^1/_2$ Stunde erfolgte. Als ich bei der Wiederholung dieser Versuche in diesem Jahre fand, daß in alkalisch gemachtem Seewasser die Befruchtung der Eier von Strongylocentrotus durch den Samen von Asterias ochracea in etwa zehn Minuten eintrat, während in neutralem See-

wasser in den ersten 24 Stunden keine Befruchtung derselben Eier durch denselben Samen erfolgte, dehnte ich die Beobachtung auf längere Zeiträume aus und fand nun, daß 30 bis 48 Stunden nach dem Zusatz des Samens in der Tat vereinzelte Eier befruchtet wurden und sich entwickelten! Die Zahl der so befruchteten Eier war ungemein klein, und man mußte lange suchen, ehe man ein befruchtetes Ei fand. Eine Schätzung der Prozentzahl ist sehr schwer; ich fand vielleicht ein oder zwei befruchtete Eier in einem Uhrschälchen voll Eier.

Diese Beobachtung legte den Gedanken nahe, daß die Hydroxylionen beschleunigend auf den Eintritt der Befruchtung einwirken. Es wurden deshalb systematische Versuche mit Seewasser gemacht, dessen Alkalinität durch Zusatz verschiedener Mengen Na_2CO_3 erhöht war. Bei dem geeigneten Grad der Alkalinität wurden die Eier in weniger als $^1/_2$ Stunde befruchtet; wurde etwas weniger Na_2CO_3 zugesetzt, so erforderte es etwa eine Stunde, bis die ersten Befruchtungen eintraten. Bei Zusatz von noch weniger Na_2CO_3 trat die Befruchtung erst nach vielen Stunden ein. Genaue Zeitmessungen sind hier nicht möglich, da in diesen unterwertigen Lösungen die Eier nicht alle gleichzeitig befruchtet werden. Man kann nur den Zeitpunkt feststellen, in dem zuerst befruchtete Eier in größerer Zahl gefunden werden, und eine solche Bestimmung ergibt die Tatsache, daß bei einer gewissen

optimalen Konzentration der Hydroxylionen (entsprechend dem Zusatz von etwa 1,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 100 ccm Seewasser) die Eier von Strongylocentrotus durch den Samen von Asterias ochracea in ungefähr zehn Minuten befruchtet werden, daß mit abnehmender Konzentration der Hydroxylionen auch die Zeit, die bis zum Eintritt der ersten Befruchtungen verfließt, auch zunimmt, obwohl diese Zunahme keine regelmäßige ist.

Ich versuchte dann, ob auch in Seewasser, dem eine kleine Menge HCl zugesetzt war, noch eine Hybridisation der Eier von Purpuratus durch Samen Asterias ochracea möglich sei. Bei Zusatz von 0,1, 0,2, 0,3 bis 0,5 $\frac{n}{10}$ HCl zu 100 ccm Seewasser fand ich nach 48 Stunden gelegentlich ein Ei mit Befruchtungsmembran, das in den ersten Stadien der Furchung war, und das sich dann regelmäßig entwickelte.

Dieselben Versuche wurden mit dem Samen der übrigen Seesterne wiederholt. Es ergab sich allgemein, daß, wenn man nur lange genug wartet — manchmal nach 48 Stunden —, eine Befruchtung des Seeigeleies mit Seesternsamen in normalem Seewasser eintritt. Allein, die Zahl der Eier, welche unter diesen Umständen befruchtet werden, ist stets sehr klein und wohl nie mehr als etwa ein Ei unter 10000. Die Versuche mit dem Samen der Schlangensterne ergaben eine interessante Ergänzung des Gesagten.

Der optimale Grad der Alkalinität, bei dem die Eier von Strongylocentrotus sofort und in großer Zahl von dem Samen des Schlangensternes befruchtet werden, ist geringer als für den Samen der Seesterne. Entsprechend erfolgt auch die Befruchtung derselben Eier in normalem Seewasser durch den Samen der Schlangensterne (wenn sie überhaupt erfolgt) schon in 8 bis 16 Stunden nach dem Samenzusatz und oft auch in größerer Zahl als bei der Anwendung des Samens der übrigen Seesterne.

IV. Hybridisation in Seewasser, dem verschiedene andere Salze zugesetzt werden.

Man kann sofortige Befruchtung der Eier des Seeigels durch den Samen der Seesterne auch dadurch hervorrufen, daß man dem Seewasser eine genügende Menge Na_2CO_3 zusetzt. Auch die Zahl der befruchteten Eier ist ebenso hoch unter diesen Umständen wie bei Zusatz der entsprechenden Mengen NaHO. Setzt man zu 100 ccm Seewasser ca. 0,3 ccm $\frac{1}{8}$ m Na_2CO_3 zu, so erfolgt eine Befruchtung der Seeigeleier durch den Samen von Asterias ochracea in weniger als einer Stunde, und wenn man die optimale Menge von Na_2CO_3 ermittelt, so erfolgt die Befruchtung in ungefähr zehn Minuten. Auch die Zahl der befruchteten Eier ist ungefähr ebenso groß wie im Falle des Zusatzes von NaHO (30—50%). Auch für die Befruchtung der Eier von Strongylocentrotus purpuratus durch den

Samen von Asterias capitata, Pycnopodia spuria und Asterina beträgt der optimale Zusatz von Na_2CO_3 etwa 0,3 ccm einer $\frac{1}{8}$ m-Lösung der letzteren Substanz zu 100 ccm Seewasser. Im Falle der Schlangensterne reicht eine erheblich geringere Menge aus, z. B. 0,1 ccm dieser Lösung oder noch weniger. — Fügt man 0,25 bis nahezu 2,0 ccm einer $\frac{3}{8}$ m $NaHCO_3$-Lösung zu 100 ccm Seewasser, so verläuft meist alles so wie in normalem Seewasser. Fügt man aber größere Mengen des Bikarbonats zu, so erfolgt nach 12 bis 24 Stunden die Befruchtung einer sehr großen Zahl von Eiern. So beobachtete ich in einem Fall, wo der Same von Asterias ochracea und die Eier von Strongylocentrotus benutzt wurden, daß in 100 ccm Seewasser + 3,0 ccm $\frac{3}{8}$ m $NaHCO_3$ 24 Stunden nach dem Zusatz des Samens die Mehrzahl aller Eier befruchtet war, und daß am nächsten Tage etwa 20% aller Eier das Blastulastadium erreichten. In der Mischung von 100 ccm Seewasser + 2 ccm $\frac{3}{8}$ m $NaHCO_3$ war nur $\frac{1}{2}$% befruchtet. Bei Zusatz von 4 ccm $\frac{3}{8}$ m $NaHCO_3$ zu 100 ccm Seewasser trat im Laufe der ersten 24 Stunden bei der Mehrzahl der Eier eine Befruchtung ein; sie entwickelten sich aber nicht. Ich vermutete, daß in diesen Lösungen Kohlensäure entweicht und ein Teil des Bikarbonats in Karbonat umgewandelt wird, wodurch die Lösung eine alkalische Reaktion annimmt. Eine Prüfung mit Phenolphthaleïn ergab in der Tat, daß alle Lösungen, welche 3 ccm $\frac{3}{8}$ m $NaHCO_3$ oder

mehr in 100 ccm Seewasser enthielten, nach 24 Stunden ausgesprochen alkalisch reagierten. Dementsprechend trat auch in flachen Schalen die Befruchtung etwas früher ein als in tiefen Schalen. Es handelte sich also hier ebenfalls um eine beschleunigende Wirkung der Hydroxylionen auf die hybride Befruchtung.

Versuche mit Zusatz von 0,5 bis 3,0 ccm $\frac{m}{2}$ Natriumtartratlösung und neutraler Kaliumzitratlösung hatten keinen deutlichen Einfluß auf die Hybridisation. Ebensowenig hatte Zusatz von Sulfaten zum Seewasser einen beschleunigenden Einfluß auf die Hybridisation. Wir dürfen also sagen, daß nach unserem jetzigen Wissen die Konzentration der Hydroxylionen im Seewasser die entscheidende Variable ist, welche die Geschwindigkeit der Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen und den Samen der Schlangensterne und die relative Zahl der befruchteten Eier bestimmt.

V. Über die Änderungen, welche die Spermatozoen der Seesterne in alkalischem Seewasser erleiden.

Die Beobachtung, daß in normalem (neutralem) Seewasser vereinzelte Seeigeleier nach sehr langer Dauer (24 Stunden oder mehr) befruchtet werden können, während in alkalischem Seewasser oder gewissen künstlichen Lösungen, welche alkalisch gemacht sind, die Befruchtung eines großen Prozent-

satzes der Eier sehr rasch erfolgt, deutet darauf hin, daß das Spermatozoon des Sersternes oder das Ei des Seeigels oder beide eine Veränderung erleiden müssen, ehe die Befruchtung möglich ist, und daß diese Veränderung rascher und in größerem Umfange erfolgt, wenn das Seewasser einen gewissen Grad der Alkalinität besitzt, als wenn es neutral ist.

Um hierüber näheren Aufschluß zu gewinnen, wurden folgende Versuche gemacht. Samen von Ochracea wurde in 100 ccm Seewasser + 2,0 $\frac{n}{10}$ NaHO gebracht. Gleichzeitig wurden Eier von Strongylocentrotus in eine Lösung derselben Art, aber ein anderes Gefäß gebracht. Unmittelbar darauf wurde je ein Tropfen Eier und Samen aus beiden Gefäßen in einem Uhrschälchen vermischt. Es dauerte sechs Minuten, bis das erste Ei eine Befruchtungsmembran bildete. Dann aber fand die Membranbildung rasch bei einer großen Zahl von Eiern statt.

Eine zweite Probe Eier und Samen wurde acht Minuten nach dem Einbringen derselben in das alkalische Seewasser in einem Uhrschälchen gemischt. Es dauerte dieses Mal nur drei Minuten, bis das erste Ei eine Befruchtung durch Bildung der Membran anzeigte, und gleich darauf bildeten viele Eier ihre Befruchtungsmembran.

13 Minuten nach dem Einbringen der Eier und Samenzellen in das alkalisch gemachte Seewasser wurde zum dritten Male je ein Tropfen Samen und

Eier aus dem alkalischen Seewasser entnommen und in demselben gemischt. Kein Ei wurde befruchtet. Ebenso ging es mit allen späteren Proben.

Es ließ sich nun zeigen, daß lediglich der Same unfähig geworden war, die Befruchtung auszuführen, während die Eier nichts an der Befruchtungsfähigkeit eingebüßt hatten. Denn wenn man frischen Samen von Ochracea zu diesen Eiern in dem alkalischen Seewasser (100 ccm Seewasser und 2 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO) zufügte, so trat die Befruchtung ein. Fügte man aber den Samen, der 13 Minuten in dem alkalischen Seewasser gewesen war, zu frischen Strongylocentrotuseiern in der alkalischen Lösung zu, so trat keine Befruchtung ein.

Es ließ sich nun auch direkt beobachten, daß mit dem Samen eine Veränderung vorgegangen war. Derselbe zeigte nämlich eine hochgradige Agglutination oder Klumpenbildung. Beim Beginn dieser Agglutination waren die einzelnen Spermatozoen noch beweglich, und die Beweglichkeit der Spermatozoen beschleunigte die Bildung von größeren Aggregaten einzelner Spermatozoen. Später aber hörte auch die Beweglichkeit der Spermatozoen auf. In das Übergangsstadium der Klumpenbildung und des Erlöschens der Beweglichkeit fällt der Verlust der Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen.

Diese Tatsachen erklären auch die Beobachtung, die ich allgemein machte, daß in 100 ccm Seewasser

+ 2,0 NaHO nur in den ersten zehn Minuten eine Befruchtung der Seeigeleier durch den Samen von Seesternen erfolgte, und daß bei längerem Warten die Zahl der Eier, welche in dieser Lösung befruchtet wurden, nicht mehr zunahm. Ich wiederholte nun denselben Versuch, nur daß ich statt einer Lösung von 100 ccm Seewasser + 2,0 $\frac{n}{10}$ NaHO eine Lösung von 100 ccm Seewasser + 1,2 $\frac{n}{10}$ NaHO anwendete. Unmittelbar nachdem die Geschlechtszellen in diese Lösung (aber in getrennte Gefäße) gebracht worden waren, wurde ein Tropfen Samen und Eier in einem Uhrschälchen vermischt. Nach acht Minuten trat die erste Befruchtung ein, und die Zahl der befruchteten Eier nahm rasch zu. Nach elf Minuten wurde eine zweite Befruchtung vorgenommen. Diesmal dauerte es nur $2^1/_2$ Minute, bis die Befruchtung begann. Nach 16, 21 und 27 Minuten wurden die Versuche wiederholt, und es dauerte immer nur etwa zwei bis drei Minuten, bis die Befruchtung eintrat.

Dann aber begann die Agglutination der Spermatozoen, und nun nahm die Zeit, welche zur Befruchtung nötig war, rasch zu, und die Zahl der Eier, welche befruchtet wurden, ebenso rasch ab: während in der ersten und zweiten Probe etwa 50% der Eier befruchtet wurden, wurden in der dritten und vierten etwa 30% befruchtet, in der fünften nur 5%, in der sechsten 1%, und dann hörte die Befruchtung bald völlig auf.

Nach einer Stunde und 20 Minuten hatte der Samen von Ochracea seine Fähigkeit, die Befruchtung auszuführen, völlig verloren. Die Eier konnten dagegen noch nach 24stündigem Verweilen in dem alkalischen Seewasser befruchtet werden, wenn denselben normaler Same desselben oder eines anderen Ochraceamännchens zugefügt wurde.

Es ist zweifellos, daß das Erlöschen der Befruchtungsfähigkeit in alkalischem Seewasser durch eine Veränderung der Spermatozoen und nicht des Eies bedingt ist, und daß dieses Erlöschen von der Erscheinung der Agglutination der Spermatozoen begleitet wird. Mein Kollege Taylor, dem ich diese Agglutination zeigte, teilte mir mit, daß die Erscheinung der Agglutination der Seesternspermatozoen in alkalischem Seewasser der Bakterienagglutination, wie sie etwa bei der Vidalschen Typhusprobe eintritt, täuschend ähnlich sieht.

Ob aber dieselben Veränderungen, welche schließlich die Agglutination der Spermatozoen von Ochracea zur Folge haben, auf einer früheren Stufe eine Vorbedingung für die Möglichkeit der Hybridisation bilden, ist möglich, aber nicht erwiesen. Daß es möglich ist, folgt daraus, daß es zuerst etwa acht Minuten dauert, bis die Seeigeleier durch Seesternsamen in Seewasser mit optimalem Alkaligehalt befruchtet werden, während sehr bald diese latente Periode auf etwa drei Minuten heruntergeht und sich auf dieser Höhe bis zum Er-

löschen der Befruchtungsfähigkeit erhält. Es müssen also in den ersten Minuten Änderungen im Spermatozoon vor sich gehen, welche die Befruchtung ermöglichen oder die Imprägnationszeit abkürzen, oder beides. Wenn man Samen von Asterias ochracea und Eier von Strongylocentrotus gesondert einige Zeit in alkalischem Seewasser läßt und sie dann in größeren Mengen von normalem Seewasser mischt, so tritt im allgemeinen keine Befruchtung der Eier ein. Es ist aber vielleicht möglich, den Zeitpunkt der Befruchtung so zu wählen, daß doch eine Befruchtung möglich ist. Ich habe versäumt, diesen Versuch anzustellen.

Ich habe mich weiterhin davon überzeugt, daß die Agglutination in alkalischem Seewasser nicht nur bei dem Samen von Asterias ochracea zu beobachten ist, sondern auch bei dem Samen von Asterias capitata, Pygnopodia spuria und Asterina. Bei den Versuchen mit dem Samen von Schlangensternen habe ich auf diesen Gegenstand nicht geachtet.

Der Same des Seeigels dagegen verhält sich ganz anders.

VI. Über den Einfluß der Reaktion des Seewassers auf die Befruchtung der Eier des Seeigels durch den Samen der eigenen Art.

Meine im vorigen Jahr veröffentlichten Versuche haben schon dargetan, daß die Lösungen, in welchen die Seeigeleier in größter Zahl von dem Samen der

Asterias befruchtet werden, die Befruchtung derselben Eier durch den Samen der eigenen Art erschweren oder unmöglich machen, vorausgesetzt, daß man den Samen einige Zeit (etwa fünf Minuten) in dieser Lösung wäscht, ehe man ihn mit dem Ei in Berührung bringt. Wenn es richtig ist, daß die alkalische van't Hoffsche Lösung eine Änderung am Samen des Seesterns hervorruft, wodurch derselbe geeigneter wird für die Befruchtung, so bringt dieselbe Lösung eine entgegengesetzte Wirkung beim Samen des Seeigels hervor.

Ich stellte nun dieses Jahr Versuche über die Befruchtung der Seeigeleier durch Samen der eigenen Art in alkalischem und saurem Seewasser an. Eier und Samen von Strongylocentrotus wurden erst gesondert fünf Minuten lang in den betreffenden Lösungen gehalten, ehe sie vermischt wurden. In einem Versuche wurden zu je 100 ccm Seewasser 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5, 1,75 und 2,0 ccm $\frac{n}{01}$ NaHO zugefügt. Zehn Minuten nach der Vermischung der Eier und Samen waren im normalen Seewasser und in dem Seewasser mit 0,25 ccm NaHO ungefähr alle Eier befruchtet; im Seewasser mit 0,5 NaHO war etwa die Hälfte befruchtet, im Seewasser mit 0,75 bis 1,25 NaHO wurde gelegentlich ein befruchtetes Ei gefunden, in dem Seewasser mit 1,5 bis 2,0 NaHO war kein Ei befruchtet. Die Eier blieben also mit dem Samen der eigenen Art gerade in dem alkalischen

Seewasser unbefruchtet, in dem sie durch den Samen der Seesterne am schnellsten und in größter Zahl befruchtet wurden.

Es wurden nun Versuche nach derselben Methode in angesäuertem Seewasser durchgeführt. In je 100 ccm Seewasser wurden 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 und 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ HCl zugefügt. In dem Seewasser, das 0,1 bis 0,7 ccm HCl enthielt, wurden fast alle Eier befruchtet, im Seewasser mit 0,8 bis 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ HCl dagegen nur wenige befruchtet. Zur Kontrolle wurden in denselben Lösungen die Eier desselben Weibchens mit Samen von Asterias ochracea befruchtet. In Seewasser mit 1,0 bis 2,0 NaHO wurden ca. 30 bis 50% Eier in ca. 20 Minuten befruchtet; in Seewasser mit weniger NaHO oder mit Säure wurde in dieser Zeit kein einziges Ei befruchtet.

Wenn man Eier des Seeigels mit Seeigelsamen in alkalischem Seewasser zusammenbringt, ohne sie vorher zu waschen, so werden die Eier befruchtet. Ich untersuchte deshalb, wie bald der Seesternsamen seine Tätigkeit, die Befruchtung auszuführen, in alkalischem Seewasser verliert, und ob mit dem Eintritt der Sterilität des Samens auch eine Agglutination[1])

[1]) Ich bitte den Leser, darauf zu achten, daß hier von der Agglutination der Spermatozoen aneinander und nicht am Ei die Rede ist. Die letztere ist eine ganz andere Erscheinung, die anscheinend auch auf anderen Bedingungen beruht.

desselben einhergeht. Eier von Strongylocentrotus und Samen derselben Form wurden getrennt in je 100 ccm Seewasser, dem 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugesetzt wurde, gebracht. Unmittelbar darauf wurden ein paar Tropfen der Eier und des Samens in einem Uhrschälchen vermischt. In etwa einer Minute begann die Befruchtung, und in $1^1/_2$ Minuten waren schon 30 bis 40% der Eier befruchtet. Vier Minuten nach Beginn des Versuches wurde eine neue Probe Eier und Samen aus dem alkalischen Seewasser in einem Uhrschälchen zusammengebracht, und auch hier begann in einer Minute die Befruchtung; die Zahl der befruchteten Eier nahm aber viel langsamer zu als bei der ersten Probe.

Zehn Minuten nach dem Einbringen der Eier und des Samens in das alkalische Seewasser wurde von neuem eine Probe der Eier und des Samens in einem Uhrschälchen zusammengebracht. Nach drei Minuten wurde ein befruchtetes Ei gefunden, aber kein weiteres Ei wurde befruchtet. Spätere Vermischungen des Samens und der Eier, die in dem alkalischen Seewasser gewesen waren, ergaben alle dasselbe negative Resultat.

Daß es sich hierbei wieder nur um eine Schädigung des Samens und nicht der Eier handelt, konnte

Die Agglutination, von der hier die Rede ist, entspricht der Erscheinung der Klumpen- oder Niederschlagsbildung, obwohl der agglutinierte Samen nicht notwendig zu Boden fällt.

dadurch erwiesen werden, daß, wenn man zu den Eiern normalen Samen desselben Männchens zusetzte, eine Befruchtung aller Eier in dem alkalischen Seewasser sowohl wie in normalem Seewasser stattfand.

Was nun die Art der Schädigung der Samenkörper betrifft, so handelte es sich nicht um eine Samenagglutination. Die Seeigelspermatozoen unterscheiden sich von den Seesternspermatozoen dadurch, daß die ersteren in alkalisch gemachtem Seewasser nicht agglutinieren, selbst wenn man zu 100 ccm Seewasser 3,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zufügt. Es handelte sich vielmehr, wie es scheint, um ein Erlöschen der Beweglichkeit der Spermatozoen des Seeigels in alkalisch gemachtem Seewasser (und in alkalischer van't Hoffscher Lösung). Diese Unbeweglichkeit läßt sich wieder rückgängig machen, wenn man die Spermatozoen in neutrales Seewasser zurückbringt, vorausgesetzt, daß sie nicht zu lange in dem alkalisch gemachten Seewasser verweilen. Die Spermatozoen, welche nach zehn Minuten langem Verweilen in 100 ccm Seewasser + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO nicht mehr imstande waren, die Eier zu befruchten, wurden zehn Minuten, nachdem sie aufhörten, die Eier zu befruchten, in normales Seewasser zurückgebracht und Eier zugesetzt. Es dauerte etwa zehn Minuten, bis der Same imstande war, die Eier zu befruchten, und die Zahl der Eier, welche befruchtet wurden, war nur $^1/_2$ %.

Offenbar hatte nur eine kleine Zahl von Spermatozoen ihre Bewegungsfähigkeit wiedererlangt.

Benutzt man Seewasser, dem mehr als 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu je 100 ccm zugefügt wurde, so erlischt die Befruchtungsfähigkeit entsprechend rascher. Aber, wie schon erwähnt, tritt nirgends Samenagglutination (d. h. Haften der Spermatozoen aneinander) ein. Ich wollte nun sehen, ob nicht vielleicht die Säure in ähnlicher Weise auf die Spermatozoen der Seeigel wirkt, wie die Alkalien auf die Spermatozoen der Seesterne. Ich benutzte deshalb Lösungen von je 100 ccm Seewasser mit 1,0, 1,5 und 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ HCl. Wenn die Seeigelspermatozoen in eine Lösung von 100 ccm Seewasser + 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ HCl kommen, so sind sie nicht sofort beweglich, sondern fangen erst nach einigen Minuten an, beweglich zu werden. Erst nach vielleicht 20 Minuten findet eine Befruchtung einer kleinen Zahl von Seeigeleiern in dieser Lösung statt. Mit weniger Säure tritt die Beweglichkeit rascher ein, und mehr Eier werden befruchtet, und zwar erfolgt auch die Befruchtung früher. Eine Klumpenbildung des Seeigelsamens trat nun häufig in angesäuertem Seewasser ein, aber nicht immer.

Ich bin deshalb nicht imstande, mit Sicherheit zu behaupten, daß die Klumpenbildung (Agglutination) der Samenfäden miteinander ein vorgerückteres Stadium der Veränderungen bildet, welche die Befruch-

tung des Seeigels ermöglichen. Wäre das richtig, so wäre damit vielleicht ein allgemeineres Kriterium für die Möglichkeit von heterogenen Hybridisationen gewonnen.

Bei der nahen Beziehung, welche zwischen dem Prozeß der Aggregatbildung (Agglutination) von in Flüssigkeit suspendierten Teilchen und ihrer elektrischen Ladung besteht, lag es nahe, zu versuchen, ob vielleicht die elektrischen Ladungen der Seestern- und Seeigelspermatozoen im Kontakt mit Seeigeleiern Unterschiede zeigen, welche dem Vermögen dieser Spermatozoen, das Seeigelei in alkalischen, neutralen oder sauren Lösungen zu befruchten, parallel laufen. Versuche hierüber sind im hiesigen Laboratorium im Gange.

VII. Über den Einfluß der Menge des Samens auf die Befruchtung.

In meinen früheren Arbeiten habe ich erwähnt, daß ich mehr Samen hinzufügte, wenn die Seeigeleier durch Seesternsamen befruchtet werden sollten, als wenn Seeigelsamen zur Anwendung kam. Der Grund war der, daß im allgemeinen bei höherer Konzentration des Seesternsamens mehr Seeigeleier befruchtet wurden. Wir können nach dem in den vorigen Abschnitten Gesagten den Grund für dieses Verhalten einsehen. Handelt es sich um eine Hybridisation in neutralen oder zu schwach alkalischen Lösungen, so

muß erst eine lange Zeit verfließen, bis vereinzelte Eier befruchtet werden. Wir glauben diese Beobachtung so auslegen zu dürfen, daß in dieser Zeit erst eine Änderung am Spermatozoon stattfindet, welche die Voraussetzung für seine Fähigkeit, das Ei zu befruchten, bildet. Aber diese Änderung trat in neutralem Seewasser nur bei einem verschwindenden Prozentsatz der Spermatozoen ein. Es ist einleuchtend, daß die Zahl der Eier, welche in solchen subalkalischen Lösungen befruchtet werden, mit der Konzentration des Samens zunehmen muß. Auf der anderen Seite haben wir gesehen, daß in Lösungen mit zu hoher Konzentration der freien Hydroxylionen die Spermatozoen sehr bald leiden, so daß der Prozentsatz derselben, der für die Befruchtung tauglich bleibt, sehr klein wird. Auch hier wird innerhalb gewisser Grenzen eine Erhöhung der Konzentration des Samens die Chancen für die Befruchtung der Eier erhöhen.

Es folgt aber auch aus dem Gesagten weiter, daß, wenn die hier erwähnten Extreme vermieden werden, d. h. wenn man alkalische Lösungen von nicht zu geringer und nicht zu exzessiver Konzentration der Hydroxylionen wählt, auch mit relativ geringer Samenkonzentration die Eier des Seeigels durch den Samen des Seesterns befruchtet werden. Ich verdünnte den Samen von Asterias ochracea soweit mit Seewasser, daß die Suspension in einer gewöhnlichen Tropf-

pipette gerade trüb erschien. Dann wurden Eier von Strongylocentrotus in eine Reihe von Gefäßen verteilt, von denen jedes 100 ccm Seewasser + 1,2 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO enthielt. Jedes Gefäß erhielt vier Tropfen Eier. Den verschiedenen Gefäßen wurde nun eine verschiedene Zahl von Tropfen der erwähnten Samensuspension zugefügt, und zwar 3, 6, 12, 24, 48 und 96. Tabelle III gibt die Resultate des Versuches.

Tabelle III.

Menge des zugefügten Samens	Zahl der befruchteten Eier nach 10 Minuten	nach 30 Minuten
3 Tropfen	40%	40%
6 „	50%	70%
12 „	70%	70%
24 „	80%	90%
48 „	80%	80%
96 „	80%	80%

Wenn man berücksichtigt, daß der Zusatz von drei Tropfen Samen in der erwähnten Verdünnung zu 100 ccm Seewasser ungefähr die eben ausreichende Konzentration ist, in welcher die Eier von Strongylocentrotus durch den Samen der eigenen Art befruchtet werden, so ist es klar, daß in geeigneter Lösung auch für die heterogene Hybridisation die Konzentration des Samens nicht viel höher zu sein braucht wie bei der reinen Befruchtung.

Schücking macht beiläufig die Angabe, daß durch Verreiben von Samen und Eiern die Befruchtung von

Asteriaseiern durch Arbaciasamen gelinge, und daß durch Verreiben von Strongylocentrotuseiern mit Asteriassamen Larven bis zur Bildung von Gastrulae entstünden[1]). Da aber die für seine Behauptung nötigen Kontrollversuche absolut fehlen, so ist es schwer einzusehen, was ihn berechtigt, die Entstehung schwimmender Larven in diesen Fällen als Wirkung des Verreibens des Samens mit den Eiern anzusehen. In seinen Versuchen über die Befruchtung der Seesterneier mit Seeigelsamen deutet alles darauf hin, daß es sich hier überhaupt nicht um Eindringen des Spermatozoons in das Ei handelte, sondern um parthenogenetische Entwicklung, wie wir im nächsten Abschnitt sehen werden. Was die Befruchtung der Seeigeleier durch Asteriassamen betrifft, so haben wir gesehen, daß eine solche Befruchtung gelegentlich und in kleinem Maßstabe in normalem Seewasser stattfindet, ohne daß ein Verreiben des Samens und der Eier nötig wird. Ich hielt es deshalb für wünschenswert, Schückings Angaben einer Prüfung zu unterwerfen. Samen von Asterias ochracea wurde in verschiedener Konzentration zu Eiern von Strongylocentrotus in normalem Seewasser zugesetzt. Eier derselben Kultur und Spermatozoen desselben Asteriasmännchens wurden in einer Reibschale verrieben. Die Energie und die Dauer des Verreibens und die Kon-

[1]) Schücking, Pflügers Archiv, Bd. 97, S. 58. 1903.

zentration des Samens variierten. In einigen Proben wurde fast reiner Samen mit nur einer Spur Seewasser angewendet. In keinem Falle fand ich, weder in den Reibeversuchen noch in den Kontrollproben, während der nächsten 24 Stunden ein einziges befruchtetes oder sich entwickelndes Ei. Der Versuch wurde oft und mit verschiedenen Kulturen mit demselben negativen Erfolg wiederholt. Da Schücking weder die Möglichkeit ausgeschlossen hat, daß es sich um eine Infektion mit Spermatozoen von Seeigeleiern handelte, noch daß sich die Seeigeleier auch unter dem Einfluß des Samens ohne Verreiben entwickelt haben würden, so vermag ich deshalb einstweilen nicht der Ansicht Schückings zuzustimmen, daß das Verreiben von Samen und Eiern infolge des dadurch herbeigeführten innigen Kontakts zwischen beiden die Befruchtung erleichtert. Die Verschmelzung beider wird vielmehr bewirkt durch die Bewegung des Spermatozoons und möglicherweise durch Oberflächenspannung. Ich hatte an die Möglichkeit gedacht, daß, wenn die Summe der Oberflächenspannungen zwischen Ei und Seewasser und Seewasser und Spermatozoon kleiner wird als die Spannung zwischen Spermatozoon und Eiprotoplasma die Verschmelzung des Eies und Spermas stattfinden muß. Es fehlt aber einstweilen noch jeder Beweis für die Richtigkeit dieser Anschauung.

VIII. Über das Verhalten der Seeigeleier in alkalischem und saurem Seewasser, wenn kein Samen zugesetzt wird.

Wenn wir behaupten, daß ein Seeigelei durch Samen des Seesterns befruchtet sei, so gründet sich das auf den Schluß, daß ohne den Zusatz lebender Seesternspermatozoen kein Ei befruchtet wird, daß dagegen nach Zusatz des Seesternsamens die Seeigeleier erst eine Membran bilden und dann sich entwickeln. Die möglichen Quellen des Irrtums sind, wie ich zum Teil schon früher angeführt habe, Infektion der Eier mit Samen der eigenen Art, künstliche Membranbildung infolge der Änderung der chemischen Natur der Lösung und künstliche Parthenogenese der Seeigeleier. Nur Kontrollversuche erlauben, die Fehlerquellen zu eliminieren. Als Kontrolle gegen die Infektion mit Samen der eigenen Art dienten Eier derselben Kultur, die in Seewasser ohne Samenzusatz blieben. Nur wo diese Kontrolleier absolut unbefruchtet blieben, wurde ein Versuch als gültig zugelassen. Was die beiden anderen Fehlerquellen betrifft, so wurden sie dadurch eliminiert, daß fast stets eine Reihe von Kontrollversuchen jeden Versuch begleitete, in welchen die Eier ohne Samen in dieselben Lösungen gebracht wurden wie die für die Hybridisation benutzten. In den im vorigen Jahr benutzten alkalischen van't Hoffschen Lösungen trat nun nie eine Membranbildung und Entwicklung der Eier ohne

Samenzusatz ein. Mit dem alkalischen Seewasser dagegen verhielt es sich etwas anders. Manchmal, aber sehr selten fanden sich Eier, welche in alkalischem Seewasser eine Membran bildeten. Diese Eier entwickelten sich jedoch nicht.

Um eine solche Membranbildung durch Alkali zu erzielen, mußte aber viel mehr Alkali zugesetzt werden, als für die Hybridisation nötig war. Aber auch dann ist eine Membranbildung sehr selten, und sie beruht offenbar auf individuellen Eigentümlichkeiten der Eier gewisser Seeigelweibchen. Es versteht sich von selbst, daß die Eier, welche sich so verhielten, von Versuchen ausgeschlossen wurden.

Was nun die künstliche Parthenogenese betrifft, so tritt in unbefruchteten Eiern, welche in Seewasser sich befinden, dem man pro 100 ccm 1 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO oder mehr zusetzt, nach vielen (ca. 12 bis 24 Stunden) ein Beginn einer parthenogenetischen Furchung ein, wie ich ja schon in meiner ersten ausführlichen Arbeit über künstliche Parthenogenese mitgeteilt hatte[1]). Je mehr NaHO dem Seewasser zugesetzt wird, ein um so größerer Prozentsatz von Eiern zeigt diese parthenogenetische Furchung, und um so früher tritt dieselbe ein. Aber die Furchung führt in diesen Fällen nie zur Entwicklung einer Blastula, sondern das Ei geht nie über ein Zwei- bis Sechs- oder Achtzellstadium

[1]) Loeb, American Journal of Physiology, vol. 3, S. 434. 1900. (Nr. V dieser Sammlung.)

(das aber höchst unregelmäßig ist) hinaus. Dann geht das Ei allmählich zugrunde, meist unter Zerfall in die einzelnen Furchungszellen. Man sieht also, daß diese Art der parthenogenetischen Furchung nicht zu einer Täuschung in bezug auf die Befruchtung der Seeigeleier durch Seesternsamen in alkalischem Seewasser führen kann, da ja in dem letzteren Falle die Befruchtungsmembran sofort gebildet wird und die Furchung wie bei normal befruchteten Eiern verläuft. Es ist aber nötig, daß alle Versuche über Hybridisation in künstlichen Lösungen von Kontrollversuchen begleitet werden, in welchen Eier desselben Weibchens, welche dem Versuch unterworfen werden, in denselben Lösungen ohne Samen bleiben.

Wie bei den Versuchen über künstliche Parthenogenese, so wird man auch bei den Versuchen über heterogene Hybridisation dann die besten Resultate erzielen, wenn man die eingehendsten und sorgfältigsten Kautelen und Kontrollversuche anwendet.

IX. Über die Befruchtung der Seesterneier durch den Samen der eigenen Art und durch Seeigelsamen.

Da die unbefruchteten Eier der Seesterne durch innere Vorgänge im Ei (vielleicht die Kohlensäurebildung?) veranlaßt werden können, sich zu Larven zu entwickeln, ohne daß irgend ein äußerer Eingriff hierfür erforderlich ist, so sind diese Eier für Hybridi-

sationsversuche nicht sehr geeignet. Man würde nur dann mit Seesterneiern erfolgreich experimentieren können, wenn dieselben in irgend einer Weise jedesmal sofort erkennen ließen, ob sie sich parthenogenetisch oder durch Eintritt eines Spermatozoons entwickeln, wie das die Seeigeleier durch die Bildung der Befruchtungsmembran tun. Ich habe nun neuerdings beobachtet, daß die Eier von Asterina, wenn sie befruchtet werden, in der Tat eine Befruchtungsmembran bilden, die ebenso deutlich, wenn nicht noch deutlicher ist wie die bei dem Seeigelei gebildeten, während diese Membranbildung bei den sich parthenogenetisch entwickelnden Eiern fehlt. Diese Eier ließen sich also dazu benutzen, um festzustellen, ob die Lösungen, in welchen die Seesterneier am besten vom Seesternsamen befruchtet werden, sich von denjenigen unterscheiden, in welchen derselbe Samen die Eier des Seeigels am besten befruchtet. Es stellte sich nun heraus, daß die Asterinaeier (welche erst drei Stunden ohne Samenzusatz im Seewasser zum Zwecke der Reifung blieben) in großer Zahl und sofort in normalem Seewasser durch Samen der eigenen Art befruchtet werden. Da dieselben Spermatozoen das Seeigelei in normalem Seewasser gar nicht oder nur ausnahmsweise und dann nach vielen Stunden erst zu befruchten imstande sind, so beweist diese Beobachtung, daß eine andere Beschaffenheit der Seesternspermatozoen für die Be-

fruchtung der Seeigeleier als für die Seesterneier erforderlich ist [1]).

In alkalisch gemachtem Seewasser war der Prozentsatz der befruchteten Eier von Asterina bei Zusatz des Samens der eigenen Art nicht größer als im normalen Seewasser. Setzte man aber zu 100 ccm Seewasser mehr als 1,25 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu, so nahm die Zahl der befruchteten Eier ab. Auch Säurezusatz zu den Eiern verringerte die Zahl der befruchteten Eier. Ich kann jedoch diese Versuche nicht als abgeschlossen ansehen, da ihre Zahl zu klein ist. Ich beabsichtige, dieselben weiterzuführen.

Was nun die Befruchtung der Eier von Asterina durch Seeigelsamen (Strongylocentrotus purpuratus) betrifft, so ist mir dieselbe bisher in keinem Falle mit Sicherheit gelungen. In allen Kontrollversuchen, wo die Eier ohne Samenzusatz blieben, war die Zahl

[1]) Ich habe wiederholt auf die Analogien zwischen Befruchtung und Infektion hingewiesen. Ich möchte der Reihe dieser Analogien eine weitere zufügen. Wenn es nicht gelingt, eine Tierart mit den Tuberkelbazillen des Menschen zu infizieren, so schließt man gewöhnlich, daß der Tuberkelbazillus des Menschen und der der betreffenden Tierform nicht identisch sind. Wenn das der einzige Grund ist, um die Identiät der beiden Mikroorganismen in Abrede zu stellen, so weisen die obigen Versuche darauf hin, daß vielleicht eine geringe chemische Verschiedenheit der Gewebesäfte beider Tierformen dafür verantwortlich ist, daß der menschliche Tuberkelbazillus nicht oder nicht so leicht in der betreffenden Tierform gedeiht. Die Richtigkeit dieser Vermutung ließe sich durch Versuche, die den Hybridisationsversuchen analog wären, prüfen.

der sich entwickelnden Eier stets genau so groß wie in den entsprechenden Lösungen, in denen Seeigelsamen zugesetzt worden war. Die Asterinaeier, welche sich bei Zusatz von Seeigelsamen entwickelten, waren stets ohne Befruchtungsmembran. Es ist aber zu berücksichtigen, daß auch die Zahl der Seeigeleier, welche durch Asterinasamen befruchtet wurden, kleiner war als die Zahl der Seeigeleier, welche durch den Samen irgend einer anderen Seesternart befruchtet wurde. Es ist vielleicht möglich, daß gerade die Keimsubstanzen von Asterina und Strongylocentrotus besonders unverträglich sind. Während daher bis jetzt keine einwandfreie Beobachtung der Befruchtung des Seesterneies durch Seeigelsamen vorliegt, ist es aber doch nicht ausgeschlossen, daß eine Fortsetzung der Versuche zu positiven Ergebnissen führt. Dabei wird man aber nicht übersehen dürfen, daß die Seesterneier im Gegensatz zu Seeigeleiern sich in normalem Seewasser ohne jeden äußeren Eingriff zu normalen Larven entwickeln können, und daß ferner aus diesem Grunde alle derartigen Versuche an Seesterneiern mit einem hohen Grade von Unsicherheit behaftet sind, wenn man nicht mit Formen arbeitet, deren Eier (wie bei Asterina) die Befruchtung durch die typische Membranbildung andeuten. Aber auch in dem Falle wird es nötig sein, festzustellen, daß eine derartige Erscheinung nicht bei den unbefruchteten Eiern vorkommt.

X. Über die spezifische Entwicklungsfähigkeit und Lebensdauer der verschiedenen Bastarde zwischen Seeigel und Seestern.

Bekanntlich hat Landois gezeigt, daß, wenn einem Tier das Blut einer fremden Tierart in die Adern geleitet wird, eine Zerstörung von roten Blutkörperchen eintritt, und daß diese unliebsamen Symptome nur dann ausbleiben, wenn die Arten, deren Blut zum Austausch gelangt, sehr nahe verwandt sind. Friedenthal hat diese Erfahrung dazu benutzt, um die Frage zu entscheiden, welche Tiere als blutsverwandt angesehen werden dürfen. Er kam zu dem Ergebnis, daß eine Blutsverwandtschaft besteht zwischen Esel und Pferd, Hase und Kaninchen, Menschen und anthropoiden Affen. Er weist darauf hin, daß diese Tatsachen vielleicht im Zusammenhang stehen mit dem Problem der Bastardierung. „Es ist wohl kein Zufall, daß von den meisten der Tiere, welche identische Blutarten aufwiesen, bekannt ist, daß sie fruchtbare Kreuzung der Arten gestatten. Pferd und Esel, Hase und Kaninchen, Hund und Wolf bringen lebende Blendlinge zur Welt. Wenn eine solche Kreuzung der Arten zwischen Ratte und Maus, Hauskatze und Ozelot wegen der verschiedenen Größe der Tiere bisher unmöglich war, wäre es doch eine lohnende Aufgabe, mit Hilfe der künstlichen Befruchtung festzustellen, ob nicht die Möglichkeit der Erzeugung lebender Mischlinge mit dem Ergebnis der Blut-

reaktionen in der Weise zusammenfällt, daß nur solche Tiere sich fruchtbar kreuzen können, deren Blutarten sich nicht gegenseitig auflösen“ [1]).

Meines Wissens existieren noch keine Versuche darüber, ob die Blutzellen des Seeigels in der Zirkulationsflüssigkeit der Seesterne oder Schlangensterne sich auflösen und vice versa. Im zoologischen System aber gehören die Seeigel, Seesterne und Schlangensterne drei verschiedenen Familien an, und von einer erfolgreichen Kreuzung sollte keine Rede sein. Es ist jedenfalls überraschend, daß eine Kreuzung der Vertreter der drei Familien doch insofern erfolgreich ist, als lebende, sich entwickelnde Bastardlarven zwischen denselben hervorgebracht werden können.

Vergleicht man aber die Entwicklung dieser heterogenen Bastardlarven mit denen der reinen Zucht, so ergeben sich schlagende Unterschiede in der Lebensfähigkeit der heterogenen Bastarde und reinen Seeigellarven. Diese Unterschiede machen sich meist erst vom zweiten oder dritten Tage an geltend und bestehen in der außerordentlich viel größeren Sterblichkeit der heterogenen Bastardlarven.

Wenn man die ersten Furchungsstadien der heterogenen Bastardlarven (Strongylocentrotuseier und Asteriassamen) verfolgt, so verläuft die Furchung anfangs fast in der gleichen Weise morphologisch und zeitlich wie bei mit Samen der eigenen Art befruchteten

[1]) H. Friedenthal, Archiv für Physiologie, Jahrg. 1900, S. 494.

Strongylocentrotuseiern. Der wesentliche Unterschied ist vielleicht der, daß bei den letzteren alle Eier derselben Zucht sich gewöhnlich in demselben Furchungsstadium befinden, während bei den heterogenen Bastarden meist große Verschiedenheiten bestehen, indem nicht alle Eier gleichzeitig befruchtet werden und sich auch vielleicht nicht gleich rasch entwickeln.

Nach 24 Stunden ist der Unterschied zwischen den heterogen und rein befruchteten Eiern viel ausgesprochener. Die Larven der letzteren schwimmen gewöhnlich bereits umher, während die ersteren erst im Übergang zum Blastulastadium sich befinden. Ferner sind viele, vielleicht die Mehrzahl, der heterogen befruchteten Eier bereits abgestorben oder in sehr frühem Furchungsstadium stehen geblieben, während in der Regel die rein befruchteten Strongylocentroten alle am Leben und im gleichen Entwicklungsstadium sind. Nach zwei Tagen gehen die reinen Strongylocentrotuslarven meist ins Pluteusstadium über, während die heterogenen Larven selbst im besten Falle im Übergang zur Gastrula sich befinden. Die letzteren Larven schwimmen auch meist am Boden, während die Strongylocentrotuslarven der reinen Zucht in großer Zahl an der Oberfläche schwimmen oder sich vom Boden erheben. Nach drei Tagen aber ist der Unterschied der Kulturen völlig überraschend: Die heterogenen Bastarde sind fast alle tot, die reinen Larven fast alle am Leben.

Bei meinen Bemühungen, die heterogenen Bastarde zu züchten, war mir das plötzliche massenhafte Absterben derselben zwischen dem zweiten und dritten Tage immer besonders aufgefallen. Man gewinnt den Eindruck, als ob die Kulturen dieser Larven plötzlich vergiftet worden seien, und vielleicht handelt es sich auch um eine langsam sich entwickelnde Giftwirkung, welche gewisse Stoffe des Seestern- oder Schlangensternsamens auf die Strongylocentrotuseier ausüben. Aber eine kleine Zahl dieser Larven bleibt doch am Leben und entwickelt sich langsam zu einem frühen Pluteusstadium. Derartige frühe Pluteusstadien findet man erst vom vierten oder fünften Tage an in den heterogenen Kulturen, während in den reinen Kulturen dieses Stadium bereits ungefähr nach 48 Stunden (bei derselben Temperatur) erreicht war. Fig. 11 und 12 ist eine Camerazeichnung von zwei derartigen heterogenen, vier Tage alten Bastarden (Strongylocentrotusei und Samen von Asterias ochracea). Der Darm ist in einem frühen Entwicklungsstadium, und das Skelett ist eben in der Anlage begriffen. Die übrigen Details sind nicht gezeichnet, da Herr Professor Heath von Stanford University, dem ich die Zeichnung verdanke, eine morphologische Analyse der in meinen Versuchen erzielten heterogenen Plutei auszuführen beabsichtigt. Ich finde unter den vielen Skizzen, die ich selbst ausgeführt habe, auch besser entwickelte heterogene Plutei als die in dieser Zeichnung repräsentierten.

Sind nun diese heterogenen Plutei einer Entwicklung in eine weitere Entwicklungsstufe fähig? Das wird sich natürlich nur durch Züchtungsversuche entscheiden lassen, die zweifellos überaus mühsam und schwierig sein werden, wenn man berücksichtigt, daß bis jetzt selbst das Züchten reiner Larven des Seeigels nur wenigen Forschern geglückt ist.

Fig. 11.

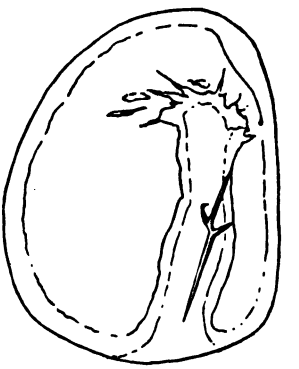


Fig. 12.

Das bisher Gesagte bezieht sich nur auf Bastarde zwischen Strongylocentrotusei und dem Samen von Asterias ochracea und capitata. Mit dem Samen der übrigen Seesterne und Schlangensterne habe ich bisher keine Plutei gezüchtet. Die Bastarde zwischen Seeigel und Schlangenstern scheinen ebenfalls eine sehr große Sterblichkeit zu besitzen.

Da nun die Befruchtung in diesen Fällen bei fast allen Versuchen in künstlichen alkalischen Lösungen oder alkalischem Seewasser erfolgt war, so lag der

Gedanke nahe, daß hohe Sterblichkeit der heterogenen Bastarde nicht so sehr durch fremdartigen Samen, sondern durch die abnorme Reaktion der Lösung resp. des Seewassers bedingt sei. Es ließ sich aber zeigen, daß der letztere Umstand keinen oder nur geringen Anteil an der übermäßigen Sterblichkeit der heterogenen Bastarde hatte. Brachte man nämlich die Eier sofort oder eine bis zwei Stunden nach der Befruchtung durch Seesternsamen in normales Seewasser zurück, so war die Sterblichkeit ungefähr ebenso groß, wie wenn sie dauernd in 100 ccm Seewasser + 1,0 $\frac{n}{10}$ NaHO verblieben. Auf der anderen Seite war die Sterblichkeit der Seeigeleier, die durch Samen der eigenen Art befruchtet wurden, nicht merklich größer in einer Lösung von 100 ccm Seewasser + 1,0 $\frac{n}{10}$ NaHO als in normalem Seewasser. Die größere Sterblichkeit der heterogenen Bastarde ist also durch den heterogenen Charakter der Geschlechtsprodukte bedingt.

XXIII.

Die Giftigkeit des atmosphärischen Sauerstoffes für die Eier des Seeigels (Strongylocentrotus purpuratus) nach dem Prozeß der Membranbildung[1]).

In einem früheren Aufsatz habe ich festgestellt, daß der Prozeß der künstlichen Membranbildung bei dem Ei des Seeigels zwei Arten von Wirkungen hervorbringt: einmal veranlaßt derselbe den Beginn der Kernteilung und zweitens die Zersetzung des Eies innerhalb einer bestimmten Anzahl von Stunden, wenn nicht vorher oder nacher eine Behandlung mit hypertonischem Seewasser (oder eine andere später zu besprechende) stattgefunden hat. Der Prozeß der Kern- und Zellteilung kann bei diesen Eiern vor sich gehen, bis sie das 6- oder 8-Zellenstadium erreicht haben; in der Regel aber bilden die Eier nur die erste Spindel, und dann beginnt der Zersetzungsprozeß. Da die Eier, bei welchen eine Membranbildung nicht stattgefunden hat, eine Woche oder länger zu leben vermögen, scheint der mit der Kern- und Zellteilung verbundene chemische Prozeß die Ursache des Auf-

[1]) University of California Publications Physiology. Vol. 3, No. 5, p. 33—37. March 24, 1906.

lösungsprozesses zu sein. Vor zehn Jahren schon zeigte ich, daß der Prozeß der Kern- und Zellteilung im Seeigelei (und wahrscheinlich gilt das für alle Eierarten) von dem Vorhandensein von freiem Sauerstoff abhängt, und aufhört, sobald derselbe durch Wasserstoff[1]) ersetzt ist oder die Oxydationen durch Cyankalium aufgehalten werden. Es ist sonach zweifellos, daß die der Eientwicklung, speziell der Kern- und Zellteilung zugrunde liegenden Vorgänge Oxydationsprozesse sind. Später hob ich die Möglichkeit hervor, daß diese Oxydationsprozesse identisch oder in naher Berührung sind mit der Synthese von Protoplasmamaterial zu Verbindungen des Kernes. Da der Membranbildungsprozeß bei dem Seeigelei diese Oxydationsprozesse in Gang bringt, untersuchte ich, ob es nicht möglich wäre, den frühen Tod dieser Eier dadurch zu verhüten, daß Oxydation hintangehalten wird. Die hierfür angewandte Methode bestand darin, die Eier Seewasser auszusetzen, durch welches ein Strom luftverdrängenden Wasserstoffs geleitet wurde. Die zweite Methode bestand in der Verhinderung der Oxydation durch Beifügen von KCN zu dem Seewasser. In der Tat konnte auf diese Weise der Tod der Eier, die eine Membran gebildet hatten, verhindert werden. Zu diesen Versuchen will ich nur wenige Erklärungen hinzufügen. Der Wasserstoff wurde aus Zink und Schwefelsäure

[1]) Loeb, Pflügers Arch. Vol. 62, p. 249. 1895.

hergestellt, dann sorgfältig in zwei Flaschen mit einer gesättigten Lösung von Na_2CO_3, ferner in einer Flasche mit einer Lösung von übermangansaurem Kali und in einer Flasche mit Seewasser gereinigt. Letzteres war leicht alkalisch gemacht und mit einigen Tropfen Phenolphthalein rot gefärbt, um zu sehen, ob der Wasserstoff wirklich frei von Säure wäre. Es wurden nur solche Versuche verwendet, bei welchen kein bemerkbarer Wechsel der Farbe in diesem Seewasser während der Dauer des Experiments stattfand.

Bei den Eiern eines Weibchens wurde der Prozeß der Membranbildung dadurch erzielt, daß man dieselben $1^1/_2$—2 Minuten lang einer Mischung von 50 ccm Seewasser und 2,9 ccm $\frac{n}{10}$ Buttersäure aussetzte. Nach 10 Minuten wurden sie in zwei Portionen geteilt. Eine wurde in eine Flasche mit Seewasser gebracht, durch welches reiner (medizinal) Sauerstoff geleitet wurde; die andere in eine Flasche mit Seewasser, aus welcher die Luft vorher entfernt wurde, und durch welche ein schwacher Strom von Wasserstoff in fortwährender Bewegung blieb. Nach 23 Stunden waren die Eier, welche mit Luft in Berührung gewesen waren, oder in dem Sauerstoffapparat sich befunden hatten, bis zur Unkenntlichkeit zerfallen. Die Eier dagegen, die nach 23 Stunden aus dem Wasserstoffapparat herausgenommen wurden, hatten dasselbe Aussehen wie beim Einbringen in den Apparat. Es konnte keine Kernteilung wegen des Sauerstoffmangels stattfinden,

und sonach schien es, daß eben der Sauerstoffmangel das Leben der Eier erhielte. Um mich aber davon zu überzeugen, daß die Eier nicht nur scheinbar, sondern wirklich lebend seien, brachte ich sie, nachdem sie aus dem Wasserstoffstrom entfernt waren, in hypertonisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm 2½ n NaCl). Teilmengen der Eier wurden nach 30' 43, 55, 65 und 80 Minuten aus dieser Lösung herausgenommen. Eine Anzahl der nach 43 und 55 Minuten und wenige der nach 65 Minuten herausgenommenen Eier entwickelten sich zu vollständigen Plutei. In einem anderen Versuch wurden die Eier eines Weibchens nach vollendeter Membranbildung in drei Gruppen von Flaschen verteilt: eine blieb in Berührung mit Luft, durch eine zweite wurde ein Strom von Sauerstoff, durch die dritte ein solcher von Wasserstoff geführt. Die Eier wurden dann in wechselnden Zwischenräumen, die von 1—10 Stunden schwankten, herausgenommen. Die Eier, welche der Luft oder reinem Sauerstoff ausgesetzt waren, fingen alle nach bestimmter Zeit an, Spindelbildung zu zeigen und nach 4—6 Stunden zu zerfallen. Die nach 10 Stunden aus dem Wasserstoffstrom genommenen Eier erscheinen dagegen normal und konnten zur Entwicklung gebracht werden. Die Versuche wurden mehrfach, stets mit dem gleichen Resultate, ausgeführt, doch wurde die Einförmigkeit der Experimente durch die neue Beobachtung unterbrochen, daß die Eier, welche nach der Membranbildung genügend

lange einem Wasserstoffstrom ausgesetzt worden waren, eine völlig normale Entwicklung ohne weitere Behandlung mit hypertonischem Seewasser durchmachen können. Die Zahl der sich unter derartigen Bedingungen entwickelnden Eier war allerdings eine sehr kleine, nie mehr als 1%, während die Behandlung mit hypertonischem Seewasser 50—100% derselben Eier zur Entwicklung brachte; doch waren die Kontrollversuche derart, daß jeder etwaige Irrtum ausgeschlossen ist. Ich versuchte die Minimalzeit festzustellen, während welcher die Eier nach der Membranbildung in dem Wasserstoffstrom zu verbleiben haben um die erwähnte Entwicklung durchmachen zu können, und fand, daß dieselbe 160 Minuten bei 15° C betrug. Ferner versuchte ich, ob durch Beifügung von KCN zu Seewasser gleiche Resultate erzielt werden könnten. Der Prozeß der Membranbildung wurde durch Buttersäure bewirkt, dann wurden die Eier 5 Minuten später in 50 ccm Seewasser gesetzt, welchem 1 ccm einer ca. 1% Lösung KCN beigefügt war. Einige Eier wurden aus dieser Lösung nach 15, 30, 45, 65 und 85 Minuten herausgenommen. Von den Eiern, welche 45 und 65 Minuten dem KCN ausgesetzt gewesen, entwickelte sich eine gewisse Anzahl. Diese Entwicklung begann erst 14 Stunden nach der Herausnahme aus dem KCN-Seewasser; auch entwickelten sich nur diejenigen Eier, welche in einer flachen Glasschale gewesen, während die in tieferen Gefäßen

unter höherer Wasserschicht befindlichen durch KCN vergiftet zugrunde gingen. Die Entwicklung war also überhaupt nur eine geringe. In einem anderen Versuch wurde 1, 2, 4 und 8 ccm einer $\frac{1}{10}$ % KCN-Lösung 50 ccm Seewasser hinzugefügt, und die Eier mit künstlich erzeugter Membranbildung in diesem Seewasser 1—23 Stunden belassen. Ein kleiner Prozentsatz guter Larven wurde erzielt, wenn man Eier 3—7 Stunden einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 2 oder 4 ccm $\frac{1}{10}$ % KCN-Lösung aussetzte. Die Furchung begann erst etwa 15 Stunden nach der Herausnahme der Eier aus dem vergifteten Seewasser. Es ist somit einleuchtend, daß die Eier eine beträchtliche Zeit unter dem Einfluß von KCN verblieben. Weitere Versuche ergaben ähnliche Resultate.

Es muß daran erinnert werden, daß, während die Eier vom Sauerstoff abgeschlossen waren oder unter dem Einfluß von KCN standen, katalytische Prozesse oder chemische Reaktionen außer Oxydationen nicht ausgeschlossen waren und mit aller Wahrscheinlichkeit sich auch in den Eiern fortgesetzt vollzogen.

Diese Versuche unterstützten die Annahme, daß der rasche Tod der Eier nach der Membranbildung mit den durch dieselbe in Gang gebrachten Entwicklungsprozessen zusammenhängt. Da diese Vorgänge wiederum oxydativen Charakter haben, so ist es begreiflich, daß ein Ausschluß von Sauerstoff oder

oxydativen Prozessen durch KCN die Zersetzung nach dem Prozeß der Membranbildung verhindert.

Wie aber war es möglich, daß ein länger dauernder Abschluß von Sauerstoff, wie die Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser, wenn auch in viel geringerem Grade, wirken konnte? Vor drei Jahren veröffentlichte E. P. Lyon[1]) eine vorzügliche Arbeit über künstliche Parthenogenese der Eier des Seeigels in Neapel, in welcher er feststellte, daß — wie er in vier Experimenten beobachtet hatte — unbefruchtete Eier des Seeigels sich allerdings nur in geringer Zahl entwickeln konnten, wenn er sie 24 Stunden in eine schwache Lösung von KCN in Seewasser gebracht hatte. Doch schien diese Methode nicht immer zuverlässig zu sein. Die Beziehung der Membranbildung zur künstlichen Parthenogenese war damals noch nicht bekannt, Lyon gebraucht daher Eier ohne Membran. Aber diese Versuche schienen zu zeigen, daß bei genügend langem und unter genügend hoher Temperatur fortgesetzten Abschluß der Eier von Sauerstoff der Entwicklungsprozeß auch ohne Membranbildung herbeigeführt werden kann. Lyon sprach einen Gedanken aus, welchen ich in Verbindung mit Versuchen über die Umbildung von negativem in positivem Heliotropismus bei Copepoden zum Ausdruck gebracht hatte, nämlich, daß hypertonisches Seewasser

[1]) E. P. Lyon, Am. Journal of Physiology. Vol. 9, p. 308. 1903.

auf die eingebrachten Eier vielleicht dadurch wirkt, daß es einen Mangel von Sauerstoff in den Zellen hervorruft. Im nächsten Aufsatz werden wir sehen, daß dieser Schluß nicht richtig ist, wenn auch in der Tat Sauerstoffmangel bei genügend langer Dauer wie hypertonisches Seewasser wirken kann.

Die Erklärung dafür finden wir, wie erwähnt, im nächsten Aufsatz. Bei meinen Versuchen über Heliotropismus fand ich auch, daß durch erniedrigte Temperatur die gleiche Wirkung wie durch Sauerstoffabschluß erzielt werden kann. Ich versuchte deshalb, ob Eier nach der Membranbildung bei niedriger Temperatur länger leben könnten. Es ist dies unzweifelhaft der Fall, und überdies machten diese Eier nach Membranbildung bei einer Temperatur unter 10° C eine Reihe von Furchungen durch, während dies bei höheren Temperaturen nicht geschah.

XXIV.

Von der Notwendigkeit des Vorhandenseins von freiem Sauerstoff in dem hypertonischen Seewasser für die Erzeugung künstlicher Parthenogenese[1]).

Die Wirkung des hypertonischen Seewassers auf die künstliche Parthenogenese des Seeigels (Strongylocentrotus purpuratus) kann auf drei verschiedene Arten gezeigt werden. Bei vorhandener Membranbildung können in der Regel alle Eier zur Entwicklung gebracht werden, wenn man sie 10 Minuten nach derselben 40—60 Minuten lang bei 15° C in hypertonisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl) legt. Die zweite Art, den Einfluß des hypertonischen Seewassers zu zeigen, besteht darin, daß man die Eier zuerst diesem aussetzt und dann 10 Minuten nachher den Prozeß der Membranbildung einleitet. Dabei haben sie mehr als doppelt so lange, wie im ersten Fall, im hypertonischen Seewasser, nämlich 90—150 Minuten, bei ca. 15° C zu verbleiben. Auch bei dieser Methode können sich alle Eier entwickeln. Nach der dritten, älteren Methode künst-

[1]) University of California publications Physiology. Vol. 3, oN. 6, p. 39—47. March 24, 1906.

licher Parthenogenese setzt man die Eier in hypertonisches Seewasser, ohne Membranbildung hervorzurufen. Auch hierbei ist eine verhältnismäßig lange Einwirkungsdauer notwendig, auch unterscheidet sich die Entwicklung der Eier in verschiedenen Punkten von derjenigen, welche Eier mit Membranbildung durchmachen. Für die dritte Methode habe ich schon in meinen früheren Arbeiten gezeigt, daß es nicht bedeutungsvoll ist, in welcher Weise die Konzentration des hypertonischen Seewassers erhöht wird. Die Wirkung bleibt stets die gleiche, nur daß bei Einbringen giftiger Bestandteile die Eier sterben. Um mich zu überzeugen, daß auch für die Entwicklung der mit Membran versehenen Eier die Art und Weise der Erhöhung des osmotischen Druckes ohne Bedeutung ist, wurden Versuche gemacht, bei welchen 8 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, Natriumazetat, Natriumcitrat oder 13 ccm $2\frac{1}{2}$ m Rohrzucker oder Harnstoff 50 ccm Seewasser beigefügt wurden. Eier mit Membranbildungen wurden diesen Lösungen 20—80 Minuten ausgesetzt. Harnstoff und Natriumazetat erwies sich als zu giftig, es wurden keine Larven aus den Eiern, die sich in diesen Lösungen befunden hatten, erzielt. Dagegen gelang dies bei den Eiern, die mit den anderen Lösungen behandelt waren. Die besten Resultate wurden mit NaCl und KCl erzielt. Wir können also feststellen, daß in diesen oder in den anderen Fällen die Entziehung einer gewissen Menge von

Wasser aus den Eiern der wesentliche Faktor für die Erzeugung künstlicher Parthenogenese ist.

Die zu lösende Frage ist, ob die Wirkung des Wasserverlustes auf das Ei, und vielleicht auf die Zellen überhaupt, chemischer oder physikalischer Natur ist. Wirkt der Wasserverlust von Seiten des Eies durch seinen Einfluß auf den Zustand der Colloide in dem Ei oder verändert er die chemischen Reaktionen in demselben? Um mich darüber zu vergewissern, machte ich eine Anzahl von Feststellungen der Temperatur, die mitbestimmend für die Wirkung des hypertonischen Seewassers ist. Hatten wir es dabei mit einer chemischen Wirkung des hypertonischen Seewassers zu tun, so mußte eine Temperaturerniedrigung um 10^0 die Zeit, welche die Eier im hypertonischen Seewasser bleiben müssen, um sich entwickeln zu können, mindestens verdoppeln. Die Versuche wurden mit Eiern angestellt, an denen künstliche Membranbildung verursacht war. Solche Eier wurden etwa 5 oder 10 Minuten nach der Membranbildung in hypertonisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl) gebracht und in verschiedenen Intervallen aus demselben herausgenommen. Wir konnten darnach die für die Erzeugung von Embryonen nötige Dauer der Einwirkung bei verschiedenen Temperaturen bestimmen. Bei einer Temperatur des hypertonischen Seewassers von über 20^0 C konnten die Eier sich nie entwickeln, das hypertonische See-

wasser schadete ihnen (die Eier der Arbacia, mit welchem ich in Wood Hole arbeitete, konnten einer Temperatur von 25° C in hypertonischem Seewasser widerstehen). Ich konnte nur bei Temperaturen von 20° oder darunter positive Resultate erzielen. In der Regel wurden die Eier desselben Weibchens in zwei Gefäße mit den gleichen hypertonischen Lösungen, deren Temperaturen um 10° oder etwas mehr verschieden waren, verteilt. Die Resultate der Versuche sind in nachstehender Tabelle dargestellt:

	Temperatur	Min. Zeit der Einwirkung, die nötig ist, um zahlreiche Larven zu erzielen	Temperaturkoeffizient für 10° Q_{10}
Experiment 1	14°	ca. 50 Minuten	
	24°	alle Eier tot	
„ 2	16°	ca. 35 Minuten	
	26°	alle Eier tot	
„ 3	4°–0,5°	210 Minuten	$Q_{10} > 3{,}0$
	15°	ca. 40 Minuten	
„ 4	5°	„ 160 „	Q_{10} ca. 3,0
	15°	„ 55 „	
„ 5	10°	„ 112 „	Q_{10} ca. 3,0
	20°	„ 32 „	

Solch eine Wirkung der Temperatur wird nur bei chemischen Reaktionen gefunden, nicht aber bei Veränderungen von physikalischem Charakter. Versuche über die Reifung des Eies eines Mollusks[1]) (Lottia) hatten schon den Gedanken nahegelegt, daß die chemischen Reaktionen, welche durch hypertonisches Seewasser bei der künstlichen Parthenogenese hervor-

[1]) Loeb, diese Serie, Vol. 3, p. 1. 1905.

gerufen werden, Oxydationsprozesse sein könnten. Ich unternahm deshalb eine große Zahl von Versuchen mit hypertonischem Seewasser, bei welchem der Sauerstoff durch eine Atmosphäre von Wasserstoff ersetzt war. Die unbefruchteten Eier des gleichen Weibchens wurden in zwei Portionen verteilt, deren jede in hypertonisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl) gelegt wurde; die eine blieb in Berührung mit Luft, während das hypertonische Seewasser mit der zweiten Portion Eier in eine Reihe von Flaschen gefüllt wurde, in denen nach Verbindung mit dem Wasserstoffapparat die Luft durch Wasserstoff ersetzt wurde. Ein Strom sorgfältig gereinigten Wasserstoffes wurde etwa $^1/_2$ Stunde vor Einsetzung der Eier durch die Flaschen getrieben und ging dann während des ganzen Versuches durch das hypertonische Seewasser, erst stärker, dann schwächer bei einer Temperatur von 15° C. Diese Eier hatten keine Membran. Nach 128 und 180 Minuten wurden sie aus dem hypertonischen Seewasser herausgenommen und in normales Seewasser versetzt. Der Unterschied zwischen beiden Portionen, nämlich der, welche im durchlüfteten hypertonischen Seewasser, und der, die in dem sauerstofffreien, hypertonischen Seewasser sich befunden hatte, war sehr auffallend. Die nach 128 Minuten aus der ersten Portion herausgenommenen Eier, also aus hypertonischem Seewasser unter Lufteinwirkung, entwickelten sich fast ohne Ausnahme; da-

gegen entwickelte sich von den Eiern, die in der durchlüfteten Portion sich 180 Minuten befunden hatten, nur ein kleiner Prozentsatz, während der Rest nach dieser Überexposition rasch zerfiel. Nicht ein Ei jedoch aus dem sauerstofffreien, hypertonischen Seewasser entwickelte sich. Diese Eier blieben, wie sie vor dem Einbringen in hypertonisches Seewasser gewesen waren. Daß sie wirklich unverändert und in keiner Weise von dem hypertonischen Seewasser angegriffen waren, wurde durch die Tatsache bestätigt, daß sie sich, wenn Sperma beigefügt wurde, ohne Ausnahme und in ganz normaler Weise entwickelten.

Bei den bis jetzt erwähnten Versuchen wurde nur die osmotische Methode künstlicher Parthenogenese angewendet. Ein Teil der Eier der folgenden Versuche wurde nach der Herausnahme aus dem hypertonischen Seewasser dem Prozeß der künstlichen Membranbildung unterworfen. Die aus dem gelüfteten hypertonischen Seewasser stammenden Eier entwickelten sich in dem obenerwähnten Verhältnis, während die aus dem sauerstofffreien hypertonischen Seewasser stammenden Eier unentwickelt blieben, aber ohne Ausnahme in der für Eier mit künstlicher Membranbildung charakteristischen Weise zerfielen[1]). Da die Möglichkeit nicht ausgeschlossen war, daß hypertonisches sauerstofffreies Seewasser doch vielleicht künstliche Parthenogenese bewirken könnte, mit

[1]) Siehe den vorhergehenden Aufsatz.

dem einzigen Unterschied, daß die Einwirkungszeit länger zu dauern hätte, wurden die Eier bei sonst gleicher Versuchsanordnung 273 und 338 Minuten in sauerstofffreiem, hypertonischen Seewasser gelassen. Das Resultat war absolut negativ, die Eier entwickelten sich nicht, sie blieben am Leben und konnten durch Beifügung von Sperma zur Entwicklung gebracht werden.

Der gleiche Versuch wurde mit dem gleichen schlagenden Erfolg wiederholt. Ich dachte, daß möglicherweise ein Unterschied darin sich finden ließe, daß der osmotische Druck des Seewassers durch Beifügen von NaCl oder eines anderen Salzes in dem Versuch erhöht wurde. Ich fand, daß, wenn KCl oder $CaCl_2$ für NaCl verwendet wurde, das Resultat dasselbe war, nämlich, daß hypertonisches Seewasser künstliche Parthenogenese nur in Verbindung mit freiem Sauerstoff bewirken kann. Eine andere mögliche Fehlerquelle war noch in Betracht zu ziehen. In dem Versuch, in welchem sich die Eier in sauerstofffreiem hypertonischen Seewasser befanden, sprudelte ein Wasserstoffstrom durch die Fläschen. Die leichte mechanische Bewegung, welche durch das Sprudeln veranlaßt wurde, hätte die Ursache sein können, daß sich die Eier in solchem hypertonischen Seewasser nicht entwickelten. Es wurde deshalb folgende Versuchsanordnung getroffen: Unbefruchtete Eier ohne Membran wurden ausgesetzt a) hypertoni-

schem Seewasser in Berührung mit Luft, b) hypertonischem Seewasser, durch welches ein Strom von reinem Sauerstoff sprudelte, und c) hypertonischem Seewasser, durch welches ein Wasserstoffstrom geleitet wurde. Nach drei Stunden wurden alle drei Portionen in normales Seewasser übergeführt. Einige verblieben dort, ohne gestört zu werden, während an dem Rest etwas später der Prozeß künstlicher Membranbildung durch Fettsäure ausgeführt wurde. Beide Portionen der Eier (a und b) aus dem hypertonischen Seewasser mit Sauerstoff, mit und ohne Membran, kamen zur Entwicklung[1]), dagegen keines der Eier, die dem hypertonischen Seewasser ohne Sauerstoff entnommen waren. Die ohne Membran verhielten sich wie normal unbefruchtete Eier; und, daß dies nicht nur so schien, sondern auch wirklich der Fall war, ging aus der Tatsache hervor, daß sich dieselben nach Beifügung von Sperma in völlig normaler Weise entwickelten. Diejenigen, welche in hypertonischem Seewasser ohne Sauerstoff gewesen waren und dann dem Prozeß der Membranbildung unterworfen wurden, zersetzten sich und verhielten sich wie die im vorhergehenden Aufsatz erwähnten Eier, in welchen nur die

[1]) Der Leser wird bemerken, daß in diesem Jahr die rein osmotische Methode der künstlichen Parthenogenese gute Resultate ergab. Ich habe den Grund für die weniger befriedigenden Resultate des letzten Jahres nicht genau erforscht, doch glaube ich, daß ich den Einfluß der Temperatur auf die nötige Einwirkungszeit nicht sorgfältig genug in Betracht zog.

Membranbildung erzeugt war, aber eine Einwirkung von hypertonischem Seewasser nicht stattgefunden hatte.

Bis jetzt haben wir nur zwei der drei für die Erzeugung künstlicher Parthenogenese durch hypertonisches Seewasser möglichen Methoden in Betracht gezogen; die dritte besteht in Erzeugung der Membranbildung und nachfolgendem Einbringen der Eier in hypertonisches Seewasser während verhältnismäßig kurzer Zeitdauer. Wenn wir versuchen, festzustellen, ob das hypertonische Seewasser nur bei Gegenwart von freiem Sauerstoff wirksam ist, müssen wir uns erinnern, daß das Ei an seiner Oberfläche oder in seinem Innern eine ganze Menge freien Sauerstoffs enthält und deshalb beim Anfang dieses Versuches das hypertonische Seewasser unter dem Einfluß dieses Sauerstoffs seine Wirkung ausübt, auch wenn der Wasserstoffstrom durch die Flaschen sprudelt. Da bei der dritten Methode künstlicher Parthenogenese die Zeit der Einwirkung des hypertonischen Seewassers auf die Eier nur kurz ist, kommt die erwähnte mögliche Fehlerquelle dabei in Betracht. Dennoch waren die Resultate sehr eindeutig. In einer Portion wurde die künstliche Membranbildung durch Buttersäure bewirkt, hierauf die Eier in zwei Flaschen mit hypertonischem Seewasser verteilt. Durch die eine wurde ein Strom reinen Sauerstoffs, durch die andere ein solcher von Wasserstoff bei einer Temperatur von

$14^1/_2{}^0$ C geleitet. Nach einer Stunde wurden beide Flaschen der Luft ausgesetzt. Aus jeder Flasche wurde ein Teil der Eier gleichzeitig herausgenommen und in normales Seewasser übergeführt; beinahe alle, welche unter Sauerstoffzutritt dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt gewesen waren, entwickelten sich, während aus denen, welche mit Wasserstoff behandelt waren, nur einige wenige Larven, nicht einmal $^1/_2\%$ aller Eier erzielt wurden. Daß sich doch einige Eier entwickelten, schreibe ich dem Umstande zu, daß mit den Eiern etwas Sauerstoff in das hypertonische Seewasser gelangte und daß es einige Zeit kostete, diesen zu entfernen. Bei mehr Vorsicht, glaube ich, würde sich kein Ei entwickelt haben. Die Eier, welche sich nicht entwickelten, zersetzten sich in derselben Weise, wie sie für Eier mit Membranbildung, welche dem hypertonischen Seewasser nicht ausgesetzt gewesen sind, charakteristisch ist. Um mich zu überzeugen, ob die Eier, welche hypertonisches Seewasser in Abwesenheit von Sauerstoff nicht zu entwickeln vermochte, sich entwickeln könnten, wenn sie in der gleichen hypertonischen Lösung mit Luft in Berührung gelassen würden, machte ich den Versuch in dieser Richtung. Eier in sauerstofffreiem hypertonischen Seewasser werden in letzterem der Luft ausgesetzt. Nach resp. 14, 26, 36, 46, 56 und 116 Minuten wurden die Eier aus dem hypertonischen Seewasser herausgenommen und in normales Seewasser übergeführt. Es ergab sich, daß

die, welche 60 Minuten in dem Seewasser ohne Sauerstoff und nachher 45 Minuten in dem gleichen Seewasser mit Sauerstoff gewesen waren, sich nahezu alle entwickelten. Es ist deshalb zweifellos, daß hypertonisches Seewasser nicht imstande war, ohne Sauerstoffzutritt künstliche Parthenogenese zu erzeugen, sondern, erst nach genügend langem Zutritt von Sauerstoff zu wirken begann.

Die Gesamtresultate dieser Versuche werden durch nachstehende Tabelle noch besser erläutert:

Zeit der Einwirkung von hypertonischem Seewasser		Prozentsatz der Eier, welche sich zu schwimmenden Larven, entwickelten
zuerst ohne Sauerstoff	darauf mit Sauerstoff	
60 Minuten	+ 0 Minuten	ca. $^1/_2$ %
„	14 „	„ 4 %
„	26 „	„ 30 %
„	36 „	„ 30 %
„	46 „	„ 90 %
„	56 „	wenige, die meisten Eier starben
„	116 „	keine Larven, alle Eier starben

Dieser Versuch wurde mit verschiedenen Änderungen, aber stets mit den gleichen schlagenden Resultaten wiederholt. Wir können also feststellen, daß künstliche Parthenogenese durch hypertonisches Seewasser nur erzielt werden kann, wenn dasselbe in Gegenwart von freiem Sauerstoff wirkt. Das schließt den Gedanken aus, daß das hypertonische Seewasser durch Verhinderung von Oxydationen wirken möchte,

ebenso daß seine Wirkung auf künstliche Parthenogenese einer durch die Entziehung von Wasser aus dem Ei verursachten Gerinnung zuzuschreiben ist. Wäre das der Fall, so würde die Anwesenheit oder Nichtanwesenheit von Sauerstoff keinen Unterschied machen.

Die Rolle des Sauerstoffes in der Wirkung des hypertonischen Seewassers können wir jedoch leicht verstehen, wenn wir die in unseren früheren Arbeiten veröffentlichten Tatsachen betrachten. Wir können als eine von mir durch eine große Zahl länger dauernder Versuche bestätigte Tatsache annehmen, daß der Prozeß der Furchung und Entwicklung zunächst ein Oxydationsprozeß ist, der zu einem plötzlichen Stillstand kommt, wenn dem Ei der freie Sauerstoff entzogen wird. Dieser Oxydationsprozeß steht zweifellos in naher Beziehung zu der Synthese des Kernmaterials aus Bestandteilen des Protoplasmas, da dieser Prozeß aufhört, wenn das Ei des Sauerstoffes beraubt wird. Bei dem unbefruchteten Ei des Seeigels kann es zu dieser Synthese nicht kommen (oder nur so schwach, daß sie nicht bemerkbar ist). Dagegen zeigen die in früheren Aufsätzen erwähnten direkten Beobachtungen, daß dieser Prozeß vor sich gehen kann, wenn wir eine künstliche Membranbildung veranlassen. Geschieht für das Ei aber sonst nichts, so stirbt es in Anwesenheit von Sauerstoff, möglicherweise weil die Oxydationen in falscher Richtung er-

folgen und zur Bildung giftiger Produkte führen. Der Wasserverlust von seiten des Eies durch hypertonisches Seewasser führt bei Anwesenheit von Sauerstoff zur Bildung gewisser Verbindungen, welche die Oxydationsprozesse in dem Ei in die richtigen Wege leiten, und die Bildung giftiger Substanzen, sowie die dadurch verursachte Zersetzung verhindern.

Solche Verbindungen können sich möglicherweise im Ei bilden, wenn die Oxydationsprozesse für längere Zeit, während andere katalytische Prozesse weiter vor sich gehen können, unterbrochen werden. Die von Lyon und mir gemachten Beobachtungen, die ich im vorhergehenden Aufsatz erwähnt habe, mögen hiermit erklärt werden.

Die in vorliegendem Aufsatz niedergelegten Resultate dürften auch eine Tatsache verständlich machen, welche ich im vorigen Jahr gefunden habe, und welche damals als ein Rätsel erschien. Wird die Membranbildung zuerst bei einem Ei erzeugt, so genügt eine Einwirkung von hypertonischem Seewasser von nur ungefähr 45—50 Minuten bei 15°, um die Entwicklung in Gang zu bringen. Wird aber das Ei zuerst dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt und die Membranbildung nachher bewirkt, so muß die Einwirkung von hypertonischem Seewasser wenigstens etwa 90 Minuten bei gleicher Temperatur dauern.

Woher kommt die so bedeutende Verschiedenheit der Reaktionszeit in beiden Fällen? Die Tatsache,

daß das hypertonische Seewasser nur in Anwesenheit von Sauerstoff wirkt, scheint dieselbe zu erklären. Der große Unterschied in dem Ei des Seeigels mit und ohne künstliche Membranbildung beruht auf dem Umstand, daß bei ersterem oxydative Prozesse angeregt oder sehr beschleunigt werden, welche bei letzterem fehlen oder nur sehr schwach sind. Wir sind versucht, anzunehmen, daß in dem Ei nach der Membranbildung Oxydasen tätig werden, die in dem Ei ohne Membran nicht oder nur in sehr geringer Menge vorhanden sind. Wenn die Wirkung des hypertonischen Seewassers die Erzeugung gewisser oxydativer Verbindungen in dem Ei ist, müssen diese ohne Zweifel sich in kürzerer Zeit in den Eiern bilden, in denen Oxydasen schon wirken, als in denen, in welchen Oxydasen fehlen.

Für den Fall, daß wir die Entwicklung des Eies des Seeigels durch zwei verschiedene Agentien bewirken, die Membranbildung und das hypertonische Seewasser, scheint die Rolle beider jetzt vollständig klar. Oxydationsprozesse werden durch die Membranbildung angeregt. Gewisse Oxydationsprodukte werden durch die Tätigkeit des hypertonischen Seewassers erzeugt, welches die Oxydation in die richtigen Wege leitet. Wir haben aber auch gesehen, daß hypertonisches Seewasser allein das unbefruchtete Ei veranlassen kann, das Pluteusstadium ohne Membranbildung zu erreichen. Zweifellos ist es also, daß

hypertonisches Seewasser imstande ist, bei genügend langer Einwirkung beide Resultate zu erzielen, d. h. die von den oxydativen Prozessen abhängige Entwicklung anzuregen oder zu beschleunigen, wie zur Bildung von Oxydationsprodukten zu führen, welche diese Oxydationen in die richtige Bahn leiten.

Die Tatsache, daß hypertonisches Seewasser imstande ist, den Entwicklungsprozeß in dem unbefruchteten Ei so verschiedener Formen (Echinodermen, Anneliden [Ophelia], Mollusken [Lottia u. a.] und sogar des Frosches) anzuregen, findet die Erklärung auch in dem Umstand, daß das hypertonische Seewasser nur in Anwesenheit von Sauerstoff wirksam ist. Der mit der Entwicklung einhergehende Prozeß ist, wie meine früheren Versuche zeigen, ein Oxydationsprozeß, und dieser kann durch Spermatozoen so gut wie durch hypertonisches Seewasser oder den Prozeß der künstlichen Membranbildung angeregt werden. Letzterer Vorgang allein genügt nicht für das Ei des Seeigels, da er dasselbe in ein anaerobes Wesen verwandelt, während die Behandlung mit hypertonischem Seewasser die Oxydationsprozesse wieder in die richtige Bahn leitet.

Wenn wir schließlich die Frage aufwerfen, wie es möglich ist, daß der Wasserverlust von seiten des Eies die Oxydationen desselben oder andere chemische Reaktionen zu beeinflussen vermag, so können wir sie nur durch den Hinweis beantworten, daß ein

Verlust von Wasser das chemische Gleichgewicht in dem Ei verändern muß. Es könnte dies durch ungleiche Veränderung des Dissoziationsgrades verschiedener Elektrolyten zustandekommen. Im Zusammenhang damit könnte die Konzentration der HO- und H-Ionen oder der Verteilungskoeffizent verschiedener Substanzen verändert werden usw.

XXV.

Über die Hemmung der Giftwirkung der hypertonischen Lösungen auf das befruchtete und unbefruchtete Ei des Seeigels durch Sauerstoffmangel[1]).

(Aus dem Herzsteinschen Laboratorium in New Monterey.)

Im Verlauf der in den beiden voraufgehenden Arbeiten erwähnten Experimente wurde ein ebenso unerwartetes wie überraschendes Resultat erzielt, nämlich daß die giftigen Wirkungen von hypertonischem Seewasser zum mindesten für längere Zeit verhindert werden, wenn der Sauerstoff der Lösung entzogen wird. Die giftigen Wirkungen von hypertonischem Seewasser waren schon in meinen ersten Versuchen über die Wirkungen von hypertonischem Seewasser auf die Furchung des Seeigeleies von mir beobachtet worden[2]). Wenn die befruchteten Eier in hypertonisches Seewasser von mäßiger Konzentration gebracht wurden, zeigten sie zunächst nur eine Verzögerung oder Unterdrückung der Zellteilung; blieben sie aber zu lange in einer solchen Lösung, so wurden sie getötet. Die für diese

[1]) University of California Publikations. Physiologie. Vol. 3, No. 7, p. 49—56, April 5, 1906.

[2]) Journal of Morphol. Vol. 7, p. 253. 1892.

vergiftende Wirkung erforderliche Zeit war um so kürzer, je höher die Konzentration war. Bei meinen Versuchen über künstliche Parthenogenese bemerkte ich, daß die Eier, welche dem hypertonischen Seewasser zu lange ausgesetzt blieben, entweder in dem hypertonischen Wasser oder nach dem Zurückbringen in normales Seewasser zugrunde gingen. In dieser Arbeit beabsichtige ich zu zeigen, daß diese Wirkungen in erster Linie durch das Vorhandensein von Sauerstoff veranlaßt wurden, und bei Abwesenheit desselben vermieden wurden.

Eier wurden mit Sperma befruchtet und nach 11 Minuten in drei Flaschen gebracht, deren jede 100 ccm Seewasser + 16 ccm $2\frac{1}{2}$ m $CaCl_2$ enthielt. Das letztere war schwach alkalisch. Eine derselben war in Berührung mit Luft, während die anderen zwei Flaschen mit einem Wasserstoffapparat verbunden wurden. Vor dem Beginn des Versuches war aus den letzteren Flaschen die Luft ausgetrieben worden. Aus einer dieser Flaschen wurden die Eier nach 4 Stunden und 14 Minuten, aus der zweiten nach 5 Stunden und 29 Minuten in normales (Luft enthaltendes) Seewasser überführt. Die Eier, welche in dem hypertonischen Seewasser der Luft ausgesetzt waren, wurden zu derselben Zeit in besondere Schalen mit gelüftetem, normalen Seewasser verbracht. Das Resultat war sehr überraschend. Die Eier, welche in dem hypertonischen Seewasser mit Luft gewesen

waren, zerfielen alle vollständig in einer Weise, die ich kurz als „schwarze Cytolyse“ bezeichnen will Zehn Prozent der Eier waren in „Schatten“ (weiße Cytolyse) verwandelt. Selbstverständlich waren die 5½ Stunden lang in dem luftgefüllten hypertonischen Seewasser verbliebenen Eier alle tot. Die Eier, die in der gleichen, jedoch sauerstofffreien Lösung gewesen waren, erwiesen sich bei dem Herausnehmen aus der Lösung alle als normal und befanden sich nach drei Stunden — die Temperatur war nur 15° — alle ohne Ausnahme in vollständig normalem 2- oder 4-Zellenstadium. Die weitere Entwicklung war ebenfalls ganz normal. Die entwickelten Larven schwammen an der Oberfläche des Gefäßes und gingen am dritten Tage (zur richtigen Zeit) in ein vollständig normales Pluteusstadium über. Hierauf wurde die Beobachtung unterbrochen. Von den Eiern, welche 5½ Stunden lang in dem hypertonischen Seewasser ohne Sauerstoff gewesen waren, furchten sich etwa 90% und entwickelten sich in vollkommen normaler Weise.

Nicht alle Eier wurden aus dem hypertonischen sauerstofflosen Seewasser nach 4¼ Stunden übergeführt. Einige wurden in der Flasche belassen, nachdem diese von dem Wasserstofferzeuger getrennt und der Luft ausgesetzt worden war. In bestimmten Zwischenräumen wurden einzelne Eier in normales Seewasser übertragen. Man fand, daß in weniger als zwei Stunden alle Eier in dem hypertonischen See-

wasser, welches jetzt in Berührung mit der Luft war, gestorben waren, während sie in demselben hypertonischen Seewasser ohne Sauerstoff am Leben geblieben waren. Es scheint somit, daß die Anwesenheit von Sauerstoff die Giftwirkung des hypertonischen Seewassers bestimmt.

Bei diesem Versuch waren die spezifischen Wirkungen eines Übermaßes von Ca und die Wirkung des hypertonischen Seewassers verbunden. Eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl ist weniger giftig, als wenn die Konzentration durch Beifügen von $CaCl_2$ erhöht wird. Eier wurden mit Sperma befruchtet und in zwei Gefäße verteilt, von denen jedes 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl enthielt. Eines derselben blieb der Luft ausgesetzt, während dem anderen der Sauerstoff durch Wasserstoffzufuhr entzogen wurde. Die Temperatur war 18° C, die Eier blieben vier Stunden in diesen Lösungen, worauf sie in normales (lufthaltiges) Seewasser überführt wurden. Während der nächsten 24 oder 48 Stunden starben die Eier, welche in sauerstoffhaltigem, hypertonischem Seewasser gewesen waren, während die Eier in sauerstofffreiem, hypertonischem Seewasser alle nach dem zweiten Tage lebten und sich zu normalen Plutei entwickelten. In einem anderen Versuch wurden befruchtete Eier 17 Stunden lang in 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl belassen. Von den Eiern, die während dieser Zeit hypertonischem Seewasser

ohne Sauerstoff ausgesetzt waren, entwickelten sich 50% zu normalen Larven, welche nach der Herausnahme aus der Lösung an der Oberfläche des Gefäßes schwammen, während von denen, die dem hypertonischen Seewasser mit Sauerstoff ausgesetzt waren, 80% schon bei der Überführung tot waren und nur wenige von den verbleibenden 20% ein frühes Blastulastadium erreichten. Keines gelangte zu einem Gastrulastadium oder erhob sich an die Oberfläche des Wassers.

In einer anderen Reihe von Experimenten wurde das Seewasser durch Beifügung von chemisch reinem Rohrzucker hypertonisch gemacht. 28 ccm $2\frac{1}{2}$ n Rohrzucker wurden 100 ccm Seewasser beigefügt; eine Schale mit dieser Lösung wurde in Berührung mit der Luft belassen, während zwei andere, luftbefreit, mit einem Wasserstofferzeuger verbunden wurden. Eier eines Weibchens wurden mit Sperma befruchtet und nach zehn Minuten in die drei Schalen verteilt. Die Temperatur war 12° C. Ein Teil blieb $2^3/_4$ Stunden, der andere $18^1/_2$ Stunden in der Lösung. Achtzig Prozent der Eier, welche in der hypertonischen Lösung bei Luftanwesenheit $2^3/_4$ Stunden gewesen waren, waren nach 12 Stunden tot, die, welche sich entwickelten, waren abnorm und starben während des ersten Tages. Die Eier, welche in der gleichen hypertonischen Lösung ohne Sauerstoff $2^3/_4$ Stunden gewesen waren, blieben fast alle lebend und entwickelten sich zu

Larven, welche zur Oberfläche aufstiegen, aber welche — wenn ich mich nicht irre — aussahen wie die Larven, welche sich in einer Mischung von Seewasser und einer isotonischen Lösung von Rohrzucker, d. i. 80 ccm Seewasser + 20 ccm $\frac{m}{3}$ Rohrzucker, entwickeln. Diese Larven entwickelten sich weiter. Diejenigen Eier, welche in dem durchlüfteten hypertonischen Seewasser 18 Stunden sich befunden hatten, waren in der Regel alle tot oder starben in dem ersten Entwicklungsstadium, während etwa 50 % der Eier, welche in der gleichen, aber sauerstofffreien Lösung gewesen waren, sich zu guten, und 30 % zu geringer ausgebildeten Blastulae entwickelten und nur 20 % während der ersten Stunde starben. Die Beobachtung dieser Larven wurde nicht fortgesetzt.

Diese und ähnliche Versuche zeigten, daß die giftigen Wirkungen von hypertonischem Seewasser durch das Fernhalten des Sauerstoffs für einige Zeit verhindert werden können. Die nächste Frage, welche sich von selbst ergab, war, ob das gleiche zutrifft, wenn zu hypertonischen Lösungen anderes als Seewasser verwendet wird. Ich werde in einer späteren Arbeit auf diesen Gegenstand zurückkommen und will mich hier auf die Veröffentlichung von nur wenigen Versuchen beschränken. Die Eier eines Weibchens wurden befruchtet und in zwei Flaschen verteilt, deren eine 50 ccm einer $\frac{m}{3}$ schwachen alkalischen $CaCl_2$-Lösung, die andere 50 ccm $\frac{m}{2}$ $CaCl_2$ enthielt. Eine

Serie dieser Flaschen war vorher von Luft frei gemacht und ein Strom von Wasserstoff fortlaufend hindurchgeführt worden. Die Eier blieben 150 Minuten in diesen Lösungen bei einer Temperatur von 15° C. Das Resultat war so schlagend, als es gewünscht werden konnte. Die Eier, welche in der $\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$-Lösung in atmosphärischer Luft sich befunden hatten, waren alle bei der ersten Untersuchung nach der Überführung in normales Seewasser tot, diejenigen dagegen, welche in der gleichen Lösung ($\frac{5}{8}$ m $CaCl_2$) in der Wasserstoffatmosphäre sich befunden hatten, waren meist (95%) normal und begannen sich normal zu furchen und sich zu normalen Plutei zu entwickeln. Von den Eiern, welche in einer $\frac{m}{2}$ $CaCl_2$-Lösung in athmosphärischer Luft waren, wurden 60% unmittelbar nach der Überführung in normales Seewasser tot gefunden, die lebenden furchten sich anomal und starben während der folgenden 24 oder 36 Stunden. Diejenigen, welche der $\frac{m}{2}$ $ClCl_2$-Lösung in Wasserstoffatmosphäre ausgesetzt waren, waren alle lebend und entwickelten sich normal zu vollständigen Plutei. Dieser Versuch wurde mit Modifikationen oft wiederholt, stets mit dem gleichen Resultat. Es soll hervorgehoben werden, daß mechanische Wirkung, verursacht durch das Gesprudel des Wasserstoffstroms, mit dem Resultat des folgenden Versuches nichts zu tun hat. Die befruchteten Eier des gleichen Weibchens wurden in drei Flaschen verteilt, deren jede 50 ccm $\frac{m}{2}$ $CaCl_2$

enthielt. Es wurde Sorge getragen, daß nur wenige Tropfen Seewasser mit den Eiern in die Lösung gelangten. Durch eine derselben floß ein Strom von sorgfältig gewaschenem Wasserstoff, durch die zweite ein solcher von Sauerstoff, während die dritte mit der Luft in Berührung blieb. Temperatur 19° C. In dieser Lösung blieben die Eier 110 Minuten und wurden dann in normales Seewasser übergeführt. Ungefähr 98% der Eier, welche in der reinen $CaCl_2$-Lösung unter Luftberührung gewesen waren, wurden nach der Überführung in normales Seewasser tot gefunden (schwarze Cytolyse). Die restierenden $1^1/_2$—2% starben während des folgenden Tages. Die Eier, welche in der $CaCl_2$-Lösung unter Einfluß des Sauerstoffstroms gewesen waren, zeigten sich etwas besser, aber das Resultat war dennoch in der Hauptsache das gleiche. Diejenigen aber, welche in der $CaCl_2$-Lösung unter Einwirkung des H-Stroms sich befunden hatten, waren fast alle lebend und furchten und entwickelten sich in ganz normaler Weise zu vollständigen Plutei.

Eine Reihe von Versuchen wurde mit hypertonischen NaCl-Lösungen gemacht. Versucht wurden die folgenden Mischungen von $\frac{3}{4}$ m-Lösungen:

(1) 50 ccm NaCl
(2) 50 „ NaCl + 1 ccm KCl
(3) 50 „ NaCl + 1 „ KCl + 1 ccm $CaCl_2$
(4) 50 „ NaCl + 1 „ KCl + 1 „ $CaCl_2$
+ 5 „ $MgCl_2$ + 0,7 ccm Na_2SO_4.

Drei Reihen solcher Lösungen wurden hergerichtet. Eine wurde mit Luft in Berührung belassen, durch die zweite ein Strom von Sauerstoff, durch die dritte ein solcher von Wasserstoff geführt. Die Eier eines Weibchens wurden befruchtet und nach 10 Minuten in diese Lösungen verteilt, in welchen sie 215 Minuten bei einer Temperatur von 16° C verblieben. Die Eier, welche in den hypertonischen Lösungen unter Luftberührung gewesen waren, zeigten entsprechend der Natur der betreffenden Lösung große Unterschiede in ihrer Erscheinung. Die aus der reinen NaCl- oder NaCl + KCl-Lösung waren alle tot, während von den Eiern aus der Mischung von NaCl, KCl und $CaCl_2$ etwa 50% lebend waren und anfingen sich zu furchen, und die Eier, die aus der vierten Lösung (in Berührung mit atmosphärischer Luft) stammten, in noch etwas größerer Zahl sich entwickelten. Die Furchung dieser Eier war jedoch anomal, und beinahe alle starben in einem frühen Blastulastadium oder in noch etwas früherem Stadium während der nächsten 24 Stunden, und keines erreichte das Gastrulastadium. Das Aussehen der Eier, welche in den gleichen vier Lösungen, aber in der Wasserstoffatmosphäre gewesen waren, zeigte einen auffallenden Unterschied gegenüber den Eiern aus den gleichen Lösungen unter Luftberührung, die wir soeben besprochen haben. Naturgemäß ist bei Abwesenheit von Sauerstoff eine Kern- und Zellteilung nicht möglich, aber

wenn die Eier aus der Lösung herausgenommen wurden, schienen sie alle völlig normal, und alle furchten sich ganz regelmäßig erst in zwei, dann in vier Zellen usw. Die Mehrzahl entwickelte sich zu Larven, welche zur Oberfläche aufstiegen und erreichte ein völlig normales Pluteusstadium. Der einzige Unterschied zwischen den Eiern aus der ersten und zweiten Lösung einerseits und der dritten und vierten Lösung andererseits war, daß einige wenige der ersteren starben, während fast alle von letzteren das Pluteusstadium erreichten, und ferner, daß die Eier aus den Lösungen 1 und 2 (in Wasserstoffatmosphäre) die Neigung hatten, zusammen zu kleben. Die Eier, welche in reinem Sauerstoff gewesen waren, zeigten sich — wenn überhaupt — ein weniges besser als die, welche mit Luft in Berührung waren. Jene aus reiner NaCl-Lösung in einer O-Atmosphäre waren bei der Herausnahme alle tot, während eine Anzahl aus der Mischung $NaCl + KCl + CaCl_2$ noch lebend waren und sich zu entwickeln begannen. Einige Larven stiegen an die Oberfläche, aber keine erreichten das Pluteusstadium.

Zwei Tatsachen waren bei diesem Versuch bemerkenswert, nämlich, daß hypertonische ($\frac{8}{4}$ n) NaCl-Lösungen ihre Giftigkeit — für eine gewisse Zeit wenigstens — verloren, wenn die Eier in der Lösung in eine Wasserstoffatmosphäre gebracht wurden, und zweitens, daß bei Vorhandensein von Luft oder Sauerstoff die Beifügung von zwei Molekülen von KCl und

$CaCl_2$ zu 100 Molekülen NaCl die hypertonische NaCl-Lösung viel weniger giftig machten.

Die Leser meiner Aufsätze über künstliche Parthenogenese werden sich erinnern, daß diese Versuche Hand in Hand gingen mit der Entdeckung der Tatsache, daß gewisse Tiere (Fundulus), welche in destilliertem Wasser leben können, und deshalb unabhängig von etwa in dem umgebenden Medium vorhandenen Salzen sind, rasch sterben, wenn sie in eine reine $\frac{m}{2}$ NaCl-Lösung gebracht werden, während sie darin leben bleiben können, wenn man KCl und $CaCl_2$ annähernd in den erwähnten Verhältnissen beifügt. Wäre es nicht möglich, daß in der reinen NaCl-Lösung die Oxydationen (und möglicherweise andere katalytische Prozesse) in unrichtiger Weise erfolgen, während die Beifügung von KCl und $CaCl_2$ die Oxydationen (und andere katalytische Prozesse) in die richtigen Wege leitet?

Weitere Versuche über diesen Gegenstand sind in Vorbereitung.

Bis jetzt haben wir nur die Verhinderung giftiger Wirkungen des hypertonischen Seewassers durch Sauerstoffentziehung bei befruchteten Eiern erörtert. Wir wollen nun auch einige wenige Versuche erwähnen, welche zeigen, daß das gleiche auch für unbefruchtete Eier mit oder ohne Membran zutrifft.

Unbefruchtete Eier vom gleichen Weibchen wurden direkt (also ohne sie dem Prozeß der Membranbildung

unterworfen zu haben) in hypertonisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm 2½ n NaCl) gesetzt und in der Lösung 153 und 218 Minuten bei einer Temperatur von 15° C belassen. Ein Teil wurde mit Luft in Berührung gelassen, während ein anderer in der hypertonischen Lösung mit einem Wasserstofferzeuger in Verbindung gebracht und dadurch von Sauerstoff befreit wurde. Wurden die Eier in normales Seewasser überführt und bald nachher untersucht, so wurden die, welche in dem hypertonischen Seewasser bei Luftanwesenheit gewesen waren, vollständig zersetzt befunden. Es war unmöglich, ein ganzes Ei zu finden; nur kleine Bruchteile waren vorhanden. Diejenigen Eier aber, welche unter Abwesenheit von Sauerstoff in dem gleichen hypertonischen Seewasser die gleiche Zeitdauer gewesen waren, erschienen völlig normal und konnten von den im normalen Seewasser belassenen nicht unterschieden werden. Einige dieser Eier zeigten später eine schwache Neigung, sich zu furchen, doch gelangte kein Ei über das Zweizellenstadium hinaus. Wurden sie am folgenden Morgen mit Sperma befruchtet, so entwickelten sich eine Anzahl von ihnen normal.

Der folgende Versuch soll zeigen, daß unbefruchtete Eier, bei welchen die Membranbildung durch Buttersäure bewirkt wurde, der Wirkung von hypertonischem Seewasser erheblich länger in einer Atmosphäre von Wasserstoff widerstehen können, als in der Luft.

Solche Eier wurden in mehrere Flaschen mit hypertonischem Seewasser verteilt; einige von ihnen blieben in Berührung mit Luft, während andere sich in einer Wasserstoffatmosphäre bei einer Temperatur von 15° C befanden. Sie blieben darin 142 Minuten. Die Eier, welche in hypertonischem Seewasser mit Luft in Berührung geblieben waren, furchten und entwickelten sich anomal und keines erreichte das Pluteusstadium; die Mehrzahl starb im Blastulastadium. Die Eier dagegen, welche in derselben Lösung in einer Wasserstoffatmosphäre sich befunden hatten, entwickelten sich normal und ein großer Prozentsatz erreichte das Pluteusstadium, nachdem sie noch ungefähr 30 Minuten hypertonischem Seewasser in atmosphärischer Luft ausgesetzt gewesen waren.

Alle diese Versuche zeigen, daß die giftigen Wirkungen von Seewasser, welches durch die Beifügung von NaCl, $CaCl_2$ oder Rohrzucker hypertonisch gemacht wird, ebensogut wie die giftigen Wirkungen hypertonischer Lösungen von NaCl und $CaCl_2$ auf befruchtete und unbefruchtete Eier des Seeigels wenigstens für einige Zeit durch Fernhalten des Sauerstoffs verhindert werden können. Diese Tatsache legt den Gedanken nahe, daß diese hypertonischen Lösungen die Oxydationserscheinungen (und möglicherweise andere katalytische Prozesse) beschleunigen oder in anderer Weise modifizieren, und daß ihre zerstörende Wirkung, wie dieselbe in diesem Aufsatz beschrieben

wurde, diesem Einfluß zuzuschreiben ist. Es stützt dies nur die in der vorhergehenden Arbeit ausgedrückte Idee, daß hypertonisches Seewasser künstliche Parthenogenese durch Beschleunigung des Oxydationsprozesses in dem reifenden Ei verursacht, ein Vorgang, der identisch oder doch in naher Verbindung mit der Bildung von Kernsubstanz aus dem Material des Protoplasmas ist. Die Besprechung über die Art, durch welche die verschiedenen Salze oder hypertonisches Seewasser die Oxydationserscheinungen verändern, soll einer späteren Arbeit überlassen bleiben.

Register[1]).

A.

Abdominalschwangerschaft 254.
Abiogenese 283.
Abnorme Furchungsstadien bei künstlicher Parthenogenese 127, 129.
Absorption von Flüssigkeiten durch Muskeln 19.
Acmaea 285, 369.
Accessorische Geschlechtsdrüsen, Bedeutung des Sekrets für Befruchtung 398.
Äthylacetat 317, 318.
Agglutination 457, 462.
— der Zellen und Eier 212.
— zwischen Ei und Samen 423.
Alkalinität des Seewassers, Beziehung zur Parthenogenese 146.
Alkalisches Seewasser, Wirkung auf Molluskeneier 371.
Alkoholgärung 233.
Ameisensäure 341.
Amöbenähnlichkeit der Chaetopteruseier 203.
Amphitrite 273, 275, 280.
Amylen 340.
Anneliden, 282.
—, künstliche Parthenogenese **167.**
Anpassung 99.
Antitoxin s. Diphtherieantitoxin.
Arbacia 76, 210, 225.
— s. Chaetopterus.
—, Wirkung verschiedener Ionen auf befruchtete Eier 85.
Ariola 284.
Aromatische Gruppe 342.
Arrhenius 367.
Artemia 224.
Arthropoden 2, 21.
Ascaris 212, 216.
Asterias 164, 454.
— capitata, Befruchtung mit Samen von 445.
— Forbesii **237.**
—, Membranbildung, Künstliche und Befruchtung, chemische **349.**
Asterina 448, 454.
Asterinaeier, Befruchtung durch Seeigelsamen 476.
Astrosphäre 74.
Aurelia 53.

[1]) Die fettgedruckten Ziffern beziehen sich auf Titel oder deuten an, daß an dieser Stelle das Hauptsächlichste über den betreffenden Gegenstand zu finden ist.

Aussehen und Furchung der Chaetopteruseier, abhängig von Beschaffenheit des Seewassers 202.
Autolyse 252, 257.

B.

Bakterien 433.
—, Wirkung auf Seesterneier 240.
Bastarde, Entwicklungsfähigkeit 477.
Bastardierung 282.
—, Holothurien 441.
—, Schlangensterne 441.
Bastardlarven, Sterblichkeit 478.
— zwischen Seeigel und Seestern, Lebensdauer und Entwicklung 428 ff.
Bataillon 293.
Befruchtung 382.
—, Theorie 229, 237, 255.
— als lebensverlängernder Eingriff 237.
— als chemischer Vorgang 262.
—, chemische bei Asterias 349.
—, chemische Vorgänge im Ei beschleunigend 256.
—, Ort derselben bei Tauben und Säugetieren 254.
—, Reaktion des Seewassers, Einfluß auf Befruchtung 460.
—, reine 441.
—, Wichtigkeit der Ionen 25.
Befruchtungsmembran 294.
— bei Asterina 474.
Befruchtungsprozeß, Natur des 19, 20 143 ff, 154, 167.
Benzol, Eireifung 379.
Bienen 223, 259.
Biologie, konstruktive Seite 33.
Bipennaria 258.
Blut s. Druck, osmotischer.
— 309, 477.
—, Alkalinität 31, 439.
—, eine physiologisch äquilibrierte Salzlösung 99.
—, Ionen 31.
—, — als Hindernis für rhythmische Zusammenziehung der Muskulatur 52.
—, Na-Ionen 46.
Bolinas 402.
Bombyx 223.
Boveri 263, 366, 429.
Branchipus 224.
Bromide 94, 97.
Bullot 292, 301.
Bumpus 110.
Buttersäure 341, 357.

C.

Ca-Proteide bei Gonionemus 55.
Calcium, Bedeutung für Befruchtuug 396.
Calciumchlorid s. Ionen, Salzlösungen.
—, Einfluß auf Furchung der Seeigeleier 20.
—, Giftigkeit 48.
Calciumionen, Antagonismus gegen Kaliumionen 68, 69.
—, Giftwirkung auf die Entwicklung 67.
Carbonate 395.

Chaetopterus 21, 82, 167, 293.
— und Arbacia, Unterschied der künstlichen Parthenogenese 216.
—, Riesenembryonen 213.
—, Verfahren der Experimente an — 168.
Chemische Bedingungen für die Reifung des Seesternes 243.
Chlornatrium s. Natriumchlorid, Kochsalz.
Ciliarbewegung 44, 49.
Citrate 395.
Clepsine 246.
Conklin 9, 78.
Contractionen der Schwimmglocke von Gonionemus 51.
Contraction des Schirms von Hydromedusen 22.
Copepoden 14, 489.
Cottrell 438, 443.
Cyankalium 257, 484.
—, Wirkung auf unbefruchtete Eier 253.
Cytolyse 299, 300, 340, 352.
— des Seeigeleies 288.

D.

Daphnia 223.
Delage 238, 272, 354, 386, 417.
Dentalium 284.
Descendenztheorie 435.
Destilliertes Wasser, giftige Wirkung 306.
—, Giftwirkung auf Arbacia-eier 98.
—, Verhalten von Fundulus an demsellben 36.
Dewitz 84.
Diphtherie-Antitoxin, Wirkung auf die Furchung 84.
Dongaster 270.
Doppelbildungen 130, 134, 210.
Doppeltkohlensaures Natrium 393, 412.
Driesch 97, 212, 275, 429.
Drillinge 130.
Druck, osmotischer der freien HO-Ionen im Blut 31.
v. Dungern 385, 387, 442.

E.

Echinodermen 21, 282.
—, heterogene Hybridisation 440.
Eier, plasmolysierte 4.
—, Tod nach Reifung ohne Bakterieneinwirkung 243.
Eireifung 237.
—, Mollusken 369.
Eiteilung, Zerlegung in zwei Prozesse 12.
Ei, Wasserbedarf 1.
Eiweiß-Ionen 30, 34.
Eiweiß, Metallverbindungen 28
Eiweißsubstanzen, Ionen 26.
Einwände gegen Experimente an Chaetopterus 181 ff.
—, mögliche, gegen die Versuche künstlicher Parthenogenese 136 ff.
Elektrolyte 26, 29, 159.
Ellipsoide Gestalt der Furchungskugeln in konzentrierterem Seewasser 3.
Embryonales Gewebe, Ionenwirkung 60.

Embryonales Gewebe, Wirkung der Ionen auf dasselbe 50.
Entwicklung als irreversibler Prozeß 235.
Entwicklungskraft der Eier 141.
Enzyme 231.
Ergebnisse über Bastardierung 435.
Erschütterung als Ursache künstlicher Parthenogenese 271, 280.
Erzeugung, künstliche von normalen Larven 19.
Essigsäure, Membranbildung der Eier 322.
Extraovate 115.

F.

Fehlerquellen der Versuche über künstliche Parthenogenese 267.
Fettsäuren 341.
Fische 2.
—, Experimente bez. der Giftigkeit von Metalleiweißionen 34.
Fischer 82, 245, 255, 259, 278, 280, 386.
Flimmerbewegung 44, 49.
Fol. 9.
Formaldehyd, Membranbildung 345.
Fraenckel 439.
Friedenthal 309, 314, 439, 477, 478.
Frosch 293.
Froscheier, Befruchtung 399.
Froschmuskel 301.
— in NaCl-Lösung 47.
Fundulus 36, 47, 221, 303, 517.
—, Verhalten gegen Sauerstoffmangel 61.
—, Verhalten in destilliertem Wasser 65.
—, Wirkung von Salzlösungen 62 ff.
Furchung, Experimente über 1.

G.

Gallenbildungen 22.
Garrey 153, 155,
Gegenwirkung des Sauerstoffmangels gegen Giftigkeit hypertonischer Lösungen 507.
Gemmill 109, 110.
Gerinnung, Bedeutung für Membranbildung 348.
Gerould 222.
Geschwülste 22.
Geschwulstbildung 234.
Gesetz von Sachs 17.
Giard 228, 229.
Gies 266.
Glycerin 93.
—, giftige Wirkung 65.
Gonionemus 41, 45, 50, 51, 53 ff., 221.
—, Organisation 51.
—, Verhalten von Teilstücken in Salzlösung 52, 54 ff.
Giftigkeit hypertonischer Lösungen 507.
Giftwirkung des Sauerstoffs 365.
Gray 165.
Greeley 238, 272, 281.

H.
Haemolyse 217, 477.
Hammersten 148.
Harnstoff 160, 268.
Harper 254.
Heath 480.
Hefe 233.
Heliotropismus 489, 490.
— 14, s. Salze, Süßwasser, Temperatur.
Herbst 75, 97, 98, 106, 212, 228, 279, 306, 317, 340, 416.
Hertwig 16, 106.
—, O. 5, 9, 83, 170, 225, 317, 340, 367.
—, R. 5, 9, 84, 317, 340
Herz, Natur der Kontraktionen derselben 71, 72.
Herzstein 369.
Heterogene Hybridisation **440**.
Heteromorphose 32, 33.
van't Hoff 367.
van't Hoffsche Lösung 310, **391**, 419.
Holothurien, Bastardierung 441.
Homogene Hybridisation 441.
Hoppe-Seyler 163.
Howell 46, 56, 58.
Hybridisation 382.
—, heterogene **440**.
— — und homogene 441.
— — in alkalischem Seewasser 443.
— in neutralem und saurem Seewasser 450.
— in Seewasser dem verschiedene Salze zugesetzt werden 453.
Hydroiden 1, 3.
Hydroidpolypen 18, 236, **237**.
Hydromedusen 22, 50.
Hydroxylionen 392.
—, als Veranlassung der Eireifung 245.
—, Rolle bei Befruchtung der Seeigeleier **437**.
Hypertonisches Seewasser, Eireifung 377.

I.
Janosik 25.
Jenkins 155.
Immunität 99, 418, 425.
Infektion, Parallele zu Befruchtung 475.
Infusorien 301.
Intracellulärer Druck 16.
Ionen 48.
— der Eiweißsubstanzen **26**.
— — Einfluß auf Kontraktionen 59.
—, Einfluß auf die Reizbarkeit der Gewebe 44.
—, Einführung durch das Spermatozoon in das Ei 24.
—, Wirkung auf befruchtete Eier von Arbacia 85 ff.
—, — auf embryonales Gewebe 60.
—, — auf Muskeln 60.
—, Wirkungen auf myogene und neurogene rhythmische Zusammenziehungen **50**.

K.
K-Proteide bei Gonionemus 55.

Kaliumchlorid s. Ionen, Salzlösungen.
—, Einfluß auf Furchung der Seeigeleier 20.
—, Giftigkeit 48.
—, Giftwirkung 66, 67.
Kaliumionen, Antagonismus gegen Ca-Ionen 68, 69.
—, Einfluß auf die Kernteilung 74.
—, spezifische Wirkung auf Chaetopteruseier 183.
Kaliumzitrat 455.
Kalzium etc. s. Calcium.
Karyokinese 74.
Karzinom 235.
Katalysator 230, 265.
Kern als Reiz auf die Teilung des Protoplasmas 15.
Kernmembran, Verflüssigung bei Zellteilung 163.
Kernteilung 12, 74.
— ohne Protoplasmateilung 8, 18, 20.
—, Unabhängigkeit von Protoplasmateilung 79.
Klärung der Samenflüssigkeit 427.
Klumpenbildung 457.
Knospenfurchung 5, 127.
Koagulation 20.
Kochsalz s. Natriumchlorid.
Kochsalzlösung, Giftwirkung 65, 66, 70.
Kohlensaures Natrium 393, 411.
Kohlenwasserstoffe 340.
Konzentrierte Lösung, Wirkung auf das Spermatozoon 10.
Konzentrierteres Seewasser, Furchung in demselben 2.
Kostanecki 285, 292.
Kreuzung von Echinodermen und Chaetopterus 216, 221.
Kritische Periode 256.
— im Leben der Eier 238.
Kulagin 84.

L.

Labferment, Wirkung auf Seeigeleier 83.
Läuse 223.
Landois 477.
Leben, Verlängerung des unbefruchteten Seesterneies 237.
Lebensdauer, verlängerte durch Verhinderung der Reifung 247.
Lebenserscheinung, Bedeutung der künstlichen Parthenogenese hierfür 229.
—, Mechanik 26.
Lewis 252, 253, 261.
Lillie 293.
—, F. 206.
Locke 35.
Loeb, J. 20, 36, 52, 61, 79, 85, 115, 128, 141, 144, 161, 236, 237, 238, 245, 252, 253, 259, 261, 278, 280, 290, 297, 301, 305, 309, 348, 349, 350, 362, 383, 386, 440, 484.
Lösungen, in denen Seeigeleier befruchtet werden 387.

Lösungen, in welchen die Eier von Strongylocentrotus purpuratus mit dem Samen von Asterias ochracea befruchtet werden können 404.
Lottia 285, 292, **369**.
—, Parthenogenese 380.
Lottiaeier, refraktäres Verhalten gegen Sperma 286.
Lyon 489, 503.

M.

Mactra 285.
Magnesiumchlorid s. Ionen, Salzlösungen.
— als Veranlassung von Parthenogenese 23.
—, Einfluß auf unbefruchtete Eier 113 ff.
—, — auf Fürchung der Seeigeleier 20.
—, Einwirkung auf Spermatozoen 142.
—, Ersatz durch andere Salze 156.
Magnesiumchloridlösung, Giftwirkung 70.
Margelis 236.
Mathews 82, 83, 238, 271, 280, 387.
Mead 21, 82, 102, 183.
Medusen 41, 51.
Mehrfachbildungen 210.
Membranbildung des Arbacia-eies 100.
— — als Kriterium der Befruchtung 107.
— der Eier durch Äthylacetat 319.
Membranbildung, künstliche bei Asterias **349**.
— des Seeigeleies 294.
—, Sekretionsprozeß 362.
Menge des Samens, Einfluß auf die Befruchtung 466.
Methoden s. Parthenogenese **267**.
Mißbildungen 215.
Mollusken, künstliche Parthenogenese **283**.
Molluskeneier, Reifung durch chemische Methode **369**.
Morgan 21, 79, 83, 141, 146, 163, 212, 386, 387.
Morphologische Beobachtungen über die Entwicklung der unbefruchteten Eier von Chaetopterus 200.
Morphologie, physiologische 1
Murbach 222.
Muskeln s. Skelettmuskeln.
—, Ionenwirkung 60.
—, rhythmische Zusammenziehung 22.
— des Skeletts, Zusammenziehungen 52.
Muskel, Wasserabsorption 27.
Muskelgewebe, Wirkung der Ionen auf dasselbe **50**.
Muskelreizung 296.
Myogene rhythmische Zusammenziehungen **50**.
— Zusammenziehungen 59.

N.

Na-Proteide bei Gonionemus 55, 56.
Natriumchlorid s. Ionen.

Natriumchlorid siehe Salzlösungen.
—, Einfluß auf Furchung der Seeigeleier 20.
—, Giftigkeit 35.
Natriumchloridlösung, giftiger Charakter 26.
—, Giftigkeit 48, 49.
Natriumcitrat, Befruchtung 395.
Natronlauge 404 ff.
—, Befruchtung 391, 392.
— ermöglicht heterogene Befruchtung 410.
Natürliche Parthenogenese 259.
— und künstliche Parthenogenese 223.
Natur des Befruchtungsprozesses 143.
— der Lösungen, in welchen sich Seeigeleier zu entwickeln vermögen 303.
Neilson 245, 255, 259, 266, 278, 386.
Nereis 276, 281.
Neurogene rhythmische Zusammenziehungen 50.
— Zusammenziehungen 58.
Neutrales Seewasser, Hybridisation 450.
Neutralität des Seewassers 438.
Norman 20, 79, 80, 81, 108, 142, 163.
Nußbaum 83.

O.

Ophelia 292.
Osmotischer Druck s. Dru
Salzlösungen.
—, Erhöhung desselben
Ursache künstlicher Parth
nogenese 158, 160.
—, Wirkung der Vermehru
des — auf Chaetopteruse
171.
Overton 46.
Oxydasen 504.
Oxysäuren 341.

P.

Parasiten der Geschwülste 234
Parthenogenese 21.
—, künstliche, Bedeutung fü
Theorie der Befruchtung 229
— — bei Mollusken 283.
— — bei Säugetieren 25.
— — des Seeigels 288.
— — Verbesserte Methode 315, 322, 329.
— — Weitere Versuche 278.
— — Zusammenhang mit Samenbefruchtung 288.
— —, Methoden und Fehlerquellen der Versuche 267.
— s. natürliche Parthenogenese.
—, natürliche und künstliche 223.
—, Resultate der Experimente 165.
— des Seelgeleies 76, 149.
—, Arten der Seeigel, bei welchen künstliche P. möglich war 164.
— bei Sauerstoffabschluß 489.
—, weitere Experimente 154.

Pasteur 233.
Pauli 33, 147.
Pemsel s. Spiro.
Petromyzon 293.
Pflanzen, Wasserbedarf 1.
Pflanzenläuse 223.
Phascolosoma 221, 276.
Physikalisch-chemische Theorie der Befruchtung 263.
Physiologisch äquilibrierte Salzlösungen 99.
Plasmolysierte Eier 4.
Plutei 109.
— aus unbefruchteten Eiern 96.
—, heterogene 481.
—, künstliche Erzeugung 19.
—, parthenogenetische 131, 135.
Podarke 221, 276, 281.
Polkörperchen im unbefruchteten Ei 21.
Polygordius 14.
Polyspermie 9, 10, 11.
Prostatasekret, Befruchtung 398.
Protoplasma, Reizbarkeit 17, 18.
—, Teilung 13.
—, Teilung als Reizwirkung 15.
—, Umbildung in Kernmasse 366.
Protoplasmateilung, Verhinderung derselben 8, 9.
Prowaseck 229.
Psyche 223.
Pycnopodia 454.
— spuria 446.

Q.

Quallen 41, 50.

R.

Ratten 398.
Reaktion des Seewassers 437.
— — Einfluß auf Befruchtung 460.
Regeneration 17, 305.
— der Hydroiden 3.
—, Beziehung zur Wassermenge 1.
Reifung des Eies durch alkalisches Seewasser 373.
— des Seesterneies, chemische Bedingungen 243.
—, Verhinderung, dadurch bedingte verlängerte Lebensdauer 247.
Reine Befruchtung 441.
Reizbarkeit 14.
—, spezifische 51.
— der Gewebe, Abhängigkeit von bestimmten Ionen 44.
Rhythmische Zuckungen der Skelettmuskeln 29.
— Zusammenziehungen der Muskeln und des Herzens, Zusammenfassung darüber 72, 73 ff.
Riesenembryonen, künstliche Erzeugung 210.
Ringer 35.
Ringersche Lösung 47, 48, 58.
Rohrzucker 93, 160, 299, 511.
—, Wirkung auf Chaetopterus 176.
Romanes 22, 51, 52.
Roux 399.

S.
Sachs 16, 17.
Salze 453.
— im Blut 55.
—, Einwirkung auf Heliotropismus 14.
Salzlösungen 268, 285, 298, 304, 309 ff., 370, 377, 414, 492, 510.
— s. osmotischer Druck.
—, physiologisch äquilibrierte 99.
—, Wirkung auf Chaetopterus-eier 171 ff.
— — auf befruchtete Eier von Arbacia 86.
Salzsäure, Wirkung auf Chaetopteruseier 196 ff.
Samen, Konzentration 389.
Sauerstoff 363.
—, Bedeutung 246.
— — für Befruchtung 416.
— — bei Eireifung 375.
—, freier als Erfordernis für künstliche Parthenogenese 491.
—, Giftigkeit für Seeigeleier 483.
—, Reifung der Eier bei Sauerstoffzutritt 248.
Sauerstoffmangel 257, 507.
—, als lebensverlängerndes Agens 251.
—, Wirkung 61.
Säuerung des Seewassers 146.
Säuren 244, 257, 280.
—, Membranbildung der Eier durch diese 322, 330.
Säurewirkung auf das Ei 322, 326.
Saures Seewasser, Hybridisation 450.
Schatten 352.
Schirm von Gonionemus, Kontraktilität 42.
Schlangensterne 448, 452, 453.
—, Bastardierung 441.
Schlußfolgerungen des Aufsatzes IX, Über Eireifung etc. 263.
Schnecken 369.
Schücking 297, 468, 469, 470.
Schwalbe, E. 234.
Schwimmglocke s. Gonionemus.
Seeigel 2, 18, 19, 44.
—, Bastarde mit Seestern 428, 477.
—, künstl. Parthenogenese 149.
Seeigelei, Befruchtung, künstliche Parthenogenese und Cytolyse 288.
Seeigeleier, Befruchtung durch Seesternsamen 382.
—, Natur der Lösungen, in denen S. sich entwickeln können 303.
—, Nichtbefruchtbarkeit durch Seesternsamen in Seewasser 422.
—, Verhalten in alkalischem und saurem Seewasser, wenn kein Samen zugefügt wird 471.
Seesterne 2.
Seestern, Barstard mit Seeigel 428.

Seesterneier, Befruchtung 473.
— — mit Samen der eigenen Art 416.
—, natürlicher Tod der reifen 239.
Seesternsamen, Befruchtung durch Seeigeleier 382.
—, Befruchtung mit 401.
Seewasser, angesäuertes 462.
—, Erhöhung der Konzentration, Entwicklung darin 2.
—, Reaktion 437.
— — und Befruchtung 460.
—, sterilisiertes 149.
Seifen, Wasserabsorption 28.
Skelettbildung von Arbacia 95.
— bei Bastardlarven 429.
Skelettmuskeln, rhythmische Zusammenziehungen 29.
Spermatozoon, Giftigkeit 217.
— als Katalysatorträger 230.
Spermatozoen, Lähmung durch konzentr. Seewasser 10.
—, Schutz gegen Verunreinigung durch S. bei Experimenten über künstliche Parthenogenese 109 ff., 150 ff.
—, Schutz gegen Befruchtung durch die S. durch Sterilisation des Seewassers 150 ff.
— der Seesterne, Änderungen in alkalischem Seewasser 455.
—, Träger der Befruchtungs- u. Vererbungseigenschaften 144.
—, Verschiedenheit der Befruchtung und Vererbung 220.
Spermatozoen, Zerstörung der Befruchtungskraft durch Konzentration des Seewassers 141.
Spiro 30.
— und Pemsel 31.
Spyrogyra 35.
Steinach 398.
Stieglitz 30.
Strongylocentrotus 153.
—, Befruchtung durch Asterias 401.
—, Membranbildg. d. Eies 295.
Strychnin 146.
Sublimat 84.
Süßwasser, Einwirkung auf Heliotropismus 14.
Sulfate 455.

T.

Tauben 254.
Taylor 341, 459.
Teillarven 286.
Teilung unter Einfluß von konzentriertem Seewasser 7.
Teilungsebene, Orientierung 16.
Temperatur 490.
—, Bedeutung f. Befruchtung 427.
—, Einfluß auf Heliotropismus 14.
—, Erhöhung und Verminderung 13.
— bei Versuchen über künstliche Parthenogenese 270.
Theorie der Befruchtung 229.
Tischomirof 84.
Tod, natürlicher 236, 431.

Toxopneustes 225.
Trochophoren, Abbildung 208.
—, Lebensdauer 209.
Tröpfchenbildung am Chaetopterusei 207.
True 35, 36.
Tuberkelbazillen 475.
Tubularia 305.
Turgor 17.

U.

Umkehrbare Entwicklungsprozesse 236.
Unmöglichkeit Blastulae ohne Erhöhung des osmotischen Drucks parthenogenetisch zu erzeugen 100.
Urzeugung 283.

V.

Vererbung 144.
Vernon 429.
Verschmelzung zweier Eier 215.
— von Eiern 275.
Vidalsche Reaktion 459.
Vierlinge 130.
Viguier 225.
—, Kritik der Versuche 226.
Vorsichtsmaßregeln bei Befruchtung 388.
— bei Experimenten üb. heterogene Hybridisation 444.
— — üb. künstliche Parthenogenese bei Anneliden 168.

W.

Wachstum 17.
—, Beziehung zur Wassermenge 1.
Wasserabgabe des Eies, maßgebend für künstliche Parthenogenese 290, 291.
Wasseraufnahme durch Seifen 28.
Wasseraufnahme durch den Muskel 27.
—, Einfluß auf Protoplasmateilung 79.
Wasserstarre 81.
Wasserstoff, Reifung der Eier bei Wasserstoffzutrit 249.
Wasserstoffionen, Einfluß auf Eiteilung 21.
Wasserverlust 14.
— s. osmotischer Druck.
— als Ursache von Parthenogenese 161.
—, Ursache künstliche Parthenogenese 493.
—, Wirkung auf Läuse 224.
Wespen 223.
Whitman 246, 254, 429.
Wilson 229, 279.
Winkler 229, 232, 399, 409.
Woods Hole 33, 41.
Würmer 21.

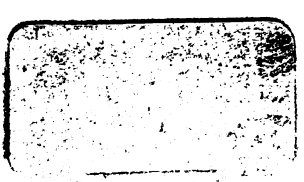
Z.

Zellteilung und Muskelkontraktilität 74.
Zerschneidung v. Medusen 51.
Zucker 268.
Zuckerlösung 414.
Zur Straßen 212, 216.
Zwerg-Blastulae 115.
Zwergembryonen 216.
—, künstliche Erzeugung 210.
Zwillinge 130.

14 DAY USE
RETURN TO DESK FROM WHICH BORROWED
BIOLOGY LIBRARY
TEL. NO. 642-2531
This book is due on the last date stamped below, or on the date to which renewed.
Renewed books are subject to immediate recall.

DEC - 7 1971
DEC 7 1971 1 8

LD 21A-15m-2,'69
(J6057s10)476—A-32

General Library
University of California
Berkeley

U.C. BERKELEY LIBRARIES
C026049893